

Aus dem Zentrum der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Carolinum)  
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
(Poliklinik für Parodontologie)  
(Leiter: Prof. Dr. Peter Eickholz)

**Entnahmestrategien für subgingivale Plaqueproben mittels  
semiquantitativer Polymerasekettenreaktion**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Irina Nicole Saskia Mayer

aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2008

## INHALTSVERZEICHNIS:

Titel und Hintergrund	1
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Gingivitis und Parodontitis	3
1.1.1 Entstehung und Entwicklung der dentalen Plaque	3
1.1.2 Von der Gingivitis zur Parodontitis	7
1.2 Einteilung der Parodontalerkrankungen	10
1.2.1 Aktuelle Nomenklatur	10
1.2.2 Chronische versus aggressive Parodontitis	11
1.3 Die orale Mikroflora	12
1.3.1 Allgemeine Grundlagen	12
1.3.2 Parodontalpathogene Bakterien	14
1.4 Mikrobiologische Testverfahren	18
1.4.1 Probenentnahme	19
1.4.2 Direkte Mikroskopie	19
1.4.3 Kulturverfahren	20
1.4.4 Immunologische Methoden (Antigen-Antikörper-Reaktionen)	21
1.4.5 enzymatischer Bakterientest	21
1.4.6 molekularbiologische Methoden	22
1.4.6.1 Nukleinsäure Sonden (DNS- bzw. Oligonukleotid-Sonden)	22
1.4.6.2 Checkerboard DNS-DNS Hybridisierung	23
1.4.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
1.5 Hypothesen	33
1.6 Zielsetzung	33
<b>2 Material und Methode</b>	<b>34</b>
2.1 Patienten	34
2.1.1 Aggressive Parodontitis	34
2.1.2 Generalisierte schwere chronische Parodontitis	34
2.1.3 Einschlusskriterien	34
2.1.4 Ausschlusskriterien	34
2.1.5 Einverständniserklärung	35
2.2 Klinische Untersuchung	35
2.3 Entnahme der subgingivalen Plaqueproben und Testverfahren	35

2.4	Statistische Analyse	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Patienten	42
3.2	Klinische Parameter	42
3.3	Analysestrategien	43
3.3.1	Nachweisrate einzelner Bakterien bei gepoolten Proben (MT4 und MT6)	43
	Ergebnistabellen Nachweisrate	43
3.3.2	Auswertung Semiquantitative Klassifikation	45
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1	Fragestellung	47
4.2	Methodik	47
4.3	Schlussfolgerung	55
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>56</b>
5.1	Summary	59
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Eigene Veröffentlichung</b>	<b>71</b>
	Danksagung	72
	Curriculum Vitae	73
	Ehrenwörtliche Erklärung	74

# Analysestrategien für subgingivale Plaqueproben mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion

## Hintergrund

Von den etwa 700 verschiedenen Bakterienarten, die die Mundhöhle besiedeln, können etwa 300 Arten subgingival gefunden werden (Paster et al. 2001, 2006) und von diesen sind einige besonders häufig mit parodontaler Destruktion assoziiert (Socransky et al. 1998). Die wichtigsten Keime sind: *Aggregatibacter* (früher: *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* ([Nørskov-Lauritsen & Kilian 2006), *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Treponema denticola* (Socransky et al. 1998). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass *A. actinomycetemcomitans* (AA) in der Ätiologie von aggressiven Parodontalerkrankungen eine besondere Bedeutung zukommt (Bragd et al. 1987). AA ist ein mikroaerophiles, fakultativ anaerobes und gram-negatives kokkoides Stäbchen, das zur Familie der *Pasteurellaceae* gehört. Es können 6 verschiedene Serotypen identifiziert werden (Zambon et al. 1983), die sich in ihrer Virulenz unterscheiden (Fives-Taylor et al. 1999, Nørskov-Lauritsen & Kilian 2006). Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass eine mit AA assoziierte Parodontitis durch eine rein mechanische Entfernung des Biofilms von der Wurzeloberfläche nicht zuverlässig erfolgreich behandelt werden kann (Christersson et al. 1985, Kornman & Robertson 1985, Mombelli et al. 1994). Für die Entscheidung, ob zusätzlich zur mechanischen antiinfektiösen Therapie systemisch Antibiotika gegeben werden sollen, hat der Nachweis von AA also Bedeutung. Je nachdem, welche Komplexe subgingivaler Mikroorganismen sich nachweisen lassen, werden unterschiedliche Antibiotikaregime vorgeschlagen (Beikler et al. 2004).

Für den quantitativen und qualitativen Nachweis dieser Keime stehen kommerziell überwiegend molekularbiologische Methoden zur Verfügung. Dazu sollen Plaqueproben aus den jeweils tiefsten parodontalen Taschen mit Blutung oder Suppuration entnommen werden. Für die systemische Antibiotikagabe in der Therapie spezieller Parodontitisformen ist nicht die subgingivale Flora einzelner Taschen, sondern ein repräsentatives Bild der subgingivalen Flora des jeweiligen Patienten relevant. Es hat sich gezeigt, dass bei Probenentnahme aus der jeweils

tiefsten Tasche eines Quadranten eine mindestens 95%ige Wahrscheinlichkeit besteht, vorhandene Parodontalpathogene nachzuweisen (Mombelli et al. 1991, 1994). Neuere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Entnahme von subgingivalen Plaqueproben an den 6 tiefsten Stellen die höchste Prävalenz ergeben (Beikler et al. 2006). Aus Kostengründen werden Proben aus mehreren Taschen zusammengefasst und als sogenannte "gepoolte" Probe ausgewertet (Flemmig et al. 1998, Beikler et al. 2005). Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass diese gepoolte Auswertungsstrategie eine zumindest gleichwertige Nachweissicherheit hat wie Einzelauswertungen der Proben (Krigar et al. 2007, Schacher et al. 2007). Allerdings zeigte sich ebenfalls eine hohe Variabilität der Analyseergebnisse, die aber von der Zahl der entnommenen Proben abzuhängen scheint (Beikler et al. 2006, Krigar et al. 2007, Schacher et al. 2007). Die Entnahme von 6 statt 4 Proben erhöht den Aufwand. Hier fehlen Informationen zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und im direkten Vergleich gepoolter Proben von 4 bzw. 6 Stellen.

Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie ist bei aggressiven und generalisierten schweren chronischen Parodontitiden sowie bei refraktären Parodontitiden und schweren Parodontitiden, die mit Systemerkrankungen (z.B. HIV-Infektion) assoziiert sind, indiziert (Flemmig et al. 1998, Beikler et al. 2005). Darüber hinaus wird der Erfolg einer systemischen Antibiotikagabe zusätzlich zur mechanischen subgingivalen Instrumentierung etwa 3 Monate nach Therapie (Reevaluation) durch eine mikrobiologische Untersuchung überprüft.

## 1 Einleitung

### 1.1. Gingivitis und Parodontitis

#### 1.1.1 Entstehung und Entwicklung der dentalen Plaque

Das mikroökologische System der Mundhöhle kann von über 700 verschiedenen Bakterienarten besiedelt werden (Paster et al. 2001, 2006). Die meisten können aber nur durch Bildung eines Biofilms an Hartsubstanzen (Zahn- und Wurzeloberflächen, Füllungsmaterialien, Prothesen, künstlichen Herzklappen usw.) auf Dauer überleben. Die bakterielle Plaque der Mundhöhle ist eine spezielle Form von Biofilm. In der Natur existieren grundsätzlich zwei Formen mikrobieller Ansammlungen: dies sind die Mikroorganismen in planktonischer Lebensform (Suspension) oder (häufiger) in Biofilmen. Biofilme werden definiert als Bakterienpopulationen, die mit einer Oberfläche verbunden und in einer extrazellulären Matrix eingebettet sind. Es konnte durch zahlreiche Studien belegt werden, dass die Plaque ein klinisch sichtbares Korrelat eines bakteriellen Biofilms darstellt, der sich auf der anorganischen Zahnoberfläche angeheftet hat. Sie zeigt strukturelle Organisation mit vorwiegend filamentförmigen Bakterien in einer organischen Matrix aus Speichelglykoproteinen und extrazellulären Bakterienprodukten und lässt sich durch Mundspülungen oder Wasserspray nicht entfernen. Plaque ist Mitverursacher für (plaqueinduzierte) Gingivopathien (Löe et al. 1965, Theilade et al. 1966, Ramberg et al. 1994, Fransson et al. 1996) und Parodontopathien (Offenbacher 1996).

Auf einer frisch gereinigten Zahnoberfläche entsteht innerhalb von Sekunden ein hauptsächlich aus Speichelproteinen, Muzinen, Mineralien und Immunoglobulinen bestehendes Häutchen (exogenes Zahnoberhäutchen, Pellikel), welches bereits nach wenigen Minuten durch sog. Pionierbakterien (z.B. *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus goordonii*, *Actinomyces naeslundii*) besiedelt wird (Bagg et al. 1999, Darveau et al. 1997). Die Pellikelbildung stellt die Voraussetzung für die Bakterienanlagerung und somit für die Plaquebildung dar. Die maximale Dicke des Pellikels (0,1-1 µm) ist nach 90 bis 120 Minuten erreicht (Bagg et al. 1999). Die bakterielle Kolonisierung des Pellikels erfolgt zunächst mit vornehmlich gram-positiven Kokken (Streptokokken) und Stäbchen (Actinomyzeten). Nach etwa zwei

bis vier Tagen kommen gramnegative Kokken (*Veillonella*) und Stäbchen (*Fusobacterium*) vor (Eickholz 2005) (Abb.1.1).

Für die Annäherung der Bakterien spielen (relativ schwache) van der Waals- und elektrostatische Kräfte (Distanz zwischen Pellikel und Bakterium: 10-100 nm) eine Rolle, ferner (stärkere) Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Hydroxylgruppen im Pellikel und den Phosphatgruppen in der Bakterienwand (Distanz: 2 nm). Nach der initialen, bakteriellen Adhäsion erfolgt eine stärkere Anlagerung und Haftung der Bakterien, was sich über kovalente Bindungen, Ionenbindungen und elektrostatische Interaktionen zwischen verschiedenen geladenen Partikeln vollzieht. Die Bindungen erstrecken sich zwischen spezifischen, auf Pellikeloberflächen, Schleimhautzellen, Proteinen und Mineralien befindlichen Rezeptoren (Liganden) und bestimmten Komponenten der Bakterien (Adhäsine) (Bagg et al. 1999).

Auf diese Weise wird die zunächst lockere Haftung der Bakterien fester. Durch die einsetzende Teilung der Mikroorganismen erfolgt eine Flächenausdehnung und Dickenzunahme der Plaque. Dabei können folgende zeitliche Phasen unterschieden werden:

#### **Entstehung von Mikrokolonien**

**Bildung von intra- sowie extrazellulären Polysachariden;**

**Entstehung eines anaeroben Milieus in der Tiefe der Plaque;**

**Bildung interbakterieller Bindungen (Listgarten 1994).**

**Zwischen den verschiedenen Bakterienspezies besteht eine Symbiose, die das Miteinander- und Überleben sichert (Darveau et al. 1997).**

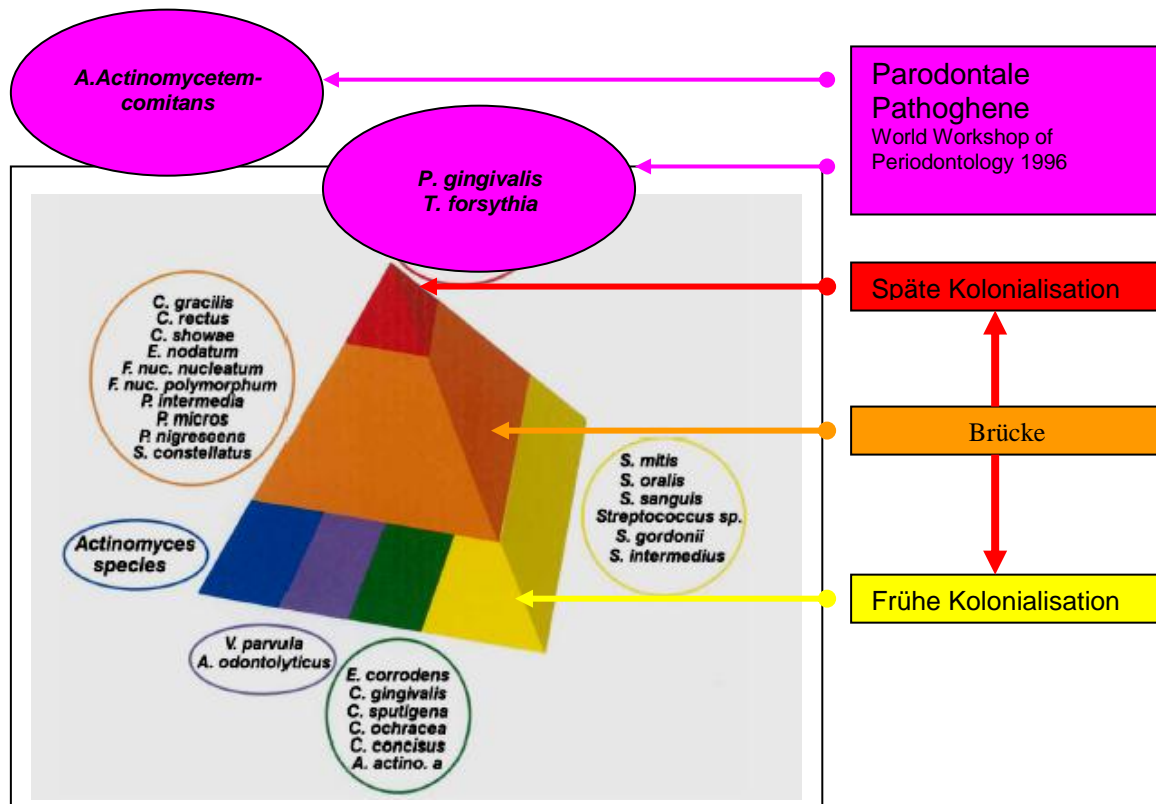


Abb. 1.1: Bakterieller Aufbau des subgingivalen Biofilms  
Modell nach Socransky et al. 1998

sehr stark pathogen	stark pathogen	moderat pathogen
<i>A. actinomycetem-comitans</i>	<i>T. denticola</i>	<i>P. micros</i>
<i>P. gingivalis</i>	<i>P. intermedia</i>	<i>F. nucleatum</i>
<i>B. forsythia</i>	<i>E. nodatum</i>	<i>C. rectus</i>
		<i>E. corrodens</i>
		<i>Capnocytophaga spec.</i>

Abb.1.2: Die Arbeitsgruppe von Slots et al. (1979) haben eine Einteilung der wichtigsten PA-Bakterien hinsichtlich ihrer Pathogenität vorgenommen.



Die Sulkusflüssigkeit enthält neben Antikörpern, Komplementfaktoren, Enzymen von Entzündungs- und Gewebszellen auch Wachstumsfaktoren und Substrat für zahlreiche (gramnegative) parodontalpathogene Keime (Plagmann 1998, Müller 2001). Darüber hinaus dient das bei entzündeter Gingiva verstärkt gebildete Gingivaexsudat, in welchem sich u.a. pellikelbildende Proteine zur Bakterienadhäsion an der Zahnoberfläche finden, für viele Bakterien als Wachstumsmedium.

Hinsichtlich des strukturellen Aufbaus einer vier Tage alten supragingivalen Plaque konnte durch Untersuchungen mit einem konfokalen Lasermikroskop gezeigt werden, dass die Plaque keine amorphe Masse, sondern vielmehr eine von Kanälen durchzogene, heterogene Matrix mit Zelltrümmern und flüssigkeitsgefüllten Räumen darstellt (Konishi et al. 2003). Im Gegensatz zur supragingivalen Plaque zeichnet sich die subgingivale Plaque durch besonders viele bewegliche, gramnegative Mikroorganismen aus (Listgarten 1994). Die subgingival gelegene Plaque setzt sich aus zwei Anteilen zusammen: einer der Zahnoberfläche anhaftenden Schicht und einer epithelwärts liegenden nicht-adhärennten Schicht. Die adhärennte Plaque kann mineralisieren und subgingivalen Zahnstein bilden, während die nichtadhärennte Schicht aufgrund ihrer Zusammensetzung und Vitalität für die Progression der parodontalen Entzündung verantwortlich gemacht wird (Page & Schroeder 1982). Geschützt vor jeglicher Form häuslicher Mundhygiene können sich subgingivale Bakterien, die nicht auf Oberflächen haften (Spirochäten), selektiv in Kolonien formieren (Müller 2001).

Während nach sieben Tagen weiterhin Streptokokken die Hauptmasse der Plaque-Mikroorganismen ausmachen, überwiegen nach 14 Tagen anaerobe Keime (Stäbchen, Filamente, Spirochäten) (Ritz 1967, Kelstrup & Theilade 1974). Ausgereifte dentale Plaque enthält  $[1-3 \times 10^8]$  Bakterien/Milligramm Nassgewicht (Socransky et al. 1963, Theilade 1984, Eickholz 2005) und hat eine Schichtdicke von ca. 0,2 mm bis 0,5 mm. Sie erfordert deshalb eine ständige Reaktionsantwort des Immunsystems. Manche Bakterien (z.B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Tannerella forsythia*) besitzen sog. Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren, welche die phagozytotische Funktion der Abwehrzellen behindern; aus diesem Grund gelten diese Bakterien als besonders parodontalpathogen (Mombelli 1998).

Allmähliches Zusammenfließen der Mikrokolonien zu einem mikrobiellen Biofilm (Marsh & Bradshaw 1995) begünstigt die intra- und interbakterielle Adhäsion und die Bildung der ausgereiften, je nach Lokalisation und Individuum unterschiedlich strukturierten supragingivalen Plaque (Listgarten 1994). Der Biofilm schützt die Bakterien gegen die Einwirkung von körpereigenen Abwehrvorgängen oder unterschiedlichen Formen antimikrobieller Therapie.

### 1.1.2 Von der Gingivitis zur Parodontitis

Die pathogenen Bakterien können aufgrund der Freisetzung von toxischen Stoffwechselprodukten und Enzymen direkt eine Entzündung des Gewebes auslösen (Darveau et al. 1997). Sobald die Immunreaktion bzw. der Entzündungsprozess im Wirtsgewebe aktiviert wird, werden Leukozyten, Fibroblasten oder Zellen des Körpergewebes (z.B. Makrophagen) angeregt, Matrix-Metalloproteinasen, Prostaglandine, Zytokine (z.B. IL-1, TNF) und andere katabole Mediatoren zu produzieren (Gemmell et al. 1997, Kornman et al. 1997). Diese Mediatoren spielen eine wichtige Rolle bei der bindegewebigen und knöchernen parodontalen Destruktion (Reynolds & Meikle 1997):

Es werden vier Phasen der parodontalen Entzündungsreaktion beschrieben (Page 1986):

**Phase der Initialläsion**

**Phase der Frühläsion**

**Phase der etablierten Läsion**

**Phase der fortgeschrittenen Läsion: Parodontitis**

Bei der gesunden Gingiva sind klinisch keine Entzündungszeichen festzustellen. Sie verläuft girlandenförmig, hat eine blassrosa Farbe und weist keine Blutung auf Sondieren auf. Da trotz individueller guter Mundhygiene eine absolute Plaquefreiheit nicht erreicht werden kann, sind bei der klinisch gesunden Gingiva histologisch schon Entzündungszeichen nachweisbar. Es entspricht in etwa dem Bild der initialen Läsion (Brecx et al. 1987). Innerhalb von vier Tagen nach Plaqueakkumulation entwickelt sich die „initiale Läsion“ (Page & Schroeder 1976), die sich auf die Sulkusregion des

Gingivasaumbereichs begrenzt. Sehr früh beobachtet man eine Vasodilatation und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität des dentogingivalen Plexus als Reaktion auf Signalstoffe (z.B. Histamin, Prostazyklin), sodass Serumproteine (z.B. Immunglobuline, Komplement) und neutrophile Granulozyten (PMN) verstärkt in das Saumepithel und den Gingivasulkus diffundieren können. Diese Phase wird heute nicht mehr als Frühstadium der Erkrankung angesehen, sondern als die physiologische Antwort der Gewebe und des Immunsystems auf eine geringfügige Plaquemenge.

Die Wanderung der Leukozyten zum Sulkus erfolgt entlang eines Konzentrationsgefälles, welches durch chemotaktische Reize der Plaquebakterien (z.B. LPS), der Wirtszellen (z.B. Interleukin 8) und im Saumepithel vorhandene Adhäsionsmoleküle bedingt wird (Moughal et al. 1992). Die neutrophilen Granulozyten bilden nicht nur eine Barriere (Leukozytenwall) gegen das Vordringen der Bakterien, sondern sind auch in der Lage sie zu phagozytieren und zu zerstören. Ungefähr eine Woche nach ungehinderter Plaqueakkumulation entwickelt sich aus der initialen unter Verstärkung der klinischen Symptome die frühe Läsion (Seymour et al. 1983, Brex et al. 1987). Eine deutliche zeitliche Abgrenzung beider Phasen ist beim Menschen nicht möglich.

Während dieser Phase nimmt die Zahl der neutrophilen Granulozyten, die durch das Bindegewebe und das Saumepithel in Richtung Sulkus wandern, weiter zu. Die Gefäßerweiterung verbleibt. Man beobachtet auch eine Erhöhung der Zahl der Makrophagen, die verschiedene Zytokine (z.B. TNF- $\alpha$ , „Transforming growth factor“ [TGF]  $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) und Chemokine (z.B. Matrix-Metallo-Proteinasen [MMPs], Prostaglandin E2 [PGE2]) produzieren (Kormann et al. 1997). Im gingivalen Bindegewebe treten zusätzlich zu Makrophagen vermehrt Lymphozyten auf, bei geringer Anzahl von Plasmazellen. Es kommt zur Bildung eines zellulären Infiltrates, das ca. 15% des Bindegewebevolumens entspricht (Kinane 2001). Die Produktion und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren ruft verschiedene Vorgänge im Gewebe hervor. So werden weitere Makrophagen und Lymphozyten von Chemokinen angelockt, IL-1 $\beta$ , MMPs und PGE2 begünstigen den Kollagenabbau, welcher im Infiltratbereich ca. 60-70% beträgt. Durch das Infiltrat wird die Gewebestruktur in apikaler und lateraler Richtung aufgelockert. Die Zellen des Saumepithels proliferieren im koronalen Bereich nach lateral mit Ausbildung von fingerförmigen Ausstülpungen (Retezapfen) ins Gewebe (Page 1986, Page &

Schroeder 1990). Es entsteht ein subgingivaler Raum, in dem sich bakterielle Plaque, Sulkusflüssigkeit und Entzündungszellen ansammeln (Payne et al. 1975, Schroeder & Lindhe 1975).

Innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der frühen Läsion tritt die Phase der etablierten Läsion ein. Sie ist charakterisiert durch subgingivale Plaqueakkumulation, weitere Proliferation von Sulkus- und Saumepithel, erhöhtem Austritt von Sulkusflüssigkeit und einem größeren subepithelialen Infiltrat, das in seinem koronalen Bereich zahlreiche Plasmazellen und Lymphozyten aufweist. In dem subgingivalen Bereich kommt es zur Ausbildung eines Taschenepithels, das dünner und fragiler ist als das Saumepithel und stellenweise Ulzerationen zeigt (Kinane & Lindhe 1997).

Diese Phase entspricht dem Zustand der chronischen Gingivitis und kann unverändert im Bereich der marginalen Gingiva über Jahre fortbestehen. Die Entfernung der ätiologischen Faktoren ermöglicht eine restitutio ad integrum. Die Ursachen die dazu führen können, dass sich eine durch bakterielle Plaque bedingte chronische Gingivitis bei manchen Menschen früher, später oder sogar nie zu einer Parodontitis weiterentwickelt, sind zu einem wesentlichen Teil identifiziert (Carranza 1996). Es ist bekannt, dass destruktive Prozesse durch prädisponisierende Faktoren wie systemische Erkrankungen oder Rauchen beeinflusst werden können.

Wenn das Gleichgewicht zwischen Plaquebelastung und Wirtsabwehr gestört wird, kann die etablierte Läsion in die fortgeschrittene Läsion der Parodontitis übergehen. Die durch bakterielle Beläge verursachte, entzündliche Erkrankung beschränkt sich nun nicht nur auf die Gingiva, sondern betrifft alle Anteile des Zahnhalteapparates (Parodontitis) wie Desmodont, Wurzelzement und Alveolarknochen.

Die fortgeschrittene Läsion ist charakterisiert durch weitere Ausdehnung der subgingivalen Plaque nach apikal, durch Proliferation des entzündlichen Zellinfiltrats nach lateral / apikal ins Bindegewebe und zum ersten Mal durch das Auftreten von Attachmentverlust und Knochenabbau (Kinane & Lindhe 1997). Plasmazellen kommen vermehrt vor. Die durch Parodontitis verursachte Destruktion des Zahnhalteapparates verläuft nicht kontinuierlich. Akute entzündliche Schübe unterbrechen lange Phasen der Ruhe, in denen sich resorptive und regenerative Vorgänge im Gleichgewicht halten (Tonetti 1994). In dieser Phase kommt es zur Ausbildung echter parodontaler Taschen. Es wird vermutet, dass die langsame Ausdehnung der Plaque in die Tiefe eine sowohl mechanische als auch

enzymatische Ablösung der anhaftenden Saumepithelzellen und eine Auflösung des Epithelansatzes verursacht (Page & Schroeder 1990). Die an der Zahnoberfläche verbliebenen Zellen sterben ab und ermöglichen somit das weitere Vordringen der Plaque nach apikal. Die übrigen verbliebenen Saumepithelzellen differenzieren zu Taschenepithelzellen, die nicht in der Lage sind, einen Epithelansatz auszubilden. Das Taschenepithel weist immer mehr Ulzerationen auf, die zur Folge haben, dass die Konzentrationsgradienten der neutrophilen Granulozyten zum Teil unterbrochen werden. Auf diese Weise können neutrophile Granulozyten und Bakterien in benachbartes Bindegewebe gelangen und dort zu Destruktionen führen (Page & Schroeder 1990). Dieser Vorgang wird unterbrochen, wenn die epitheliale Barriere sich wieder verschließt. Die neutrophilen Granulozyten haben zwei Funktionen: eine protektive Funktion durch die Phagozytose und Zerstörung der Plaquebakterien und/oder eine destruktive Funktion durch die Freisetzung proteolytischer Enzyme (z.B. Kollagenase).

## **1.2 Einteilung der Parodontalerkrankungen**

### **1.2.1 Aktuelle Nomenklatur**

Aufgrund wissenschaftlicher Fortschritte müssen ständige Veränderungen der vorhandenen Nomenklatur vorgenommen werden. Dies führte 1997 zur Gründung eines Komitees durch die „American Academy of Periodontology“. 1999 wurde von diesem Komitee beim „International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions“, in Oak Brook, Illinois, USA, eine neue Klassifizierung der Parodontalerkrankungen erarbeitet und vorgestellt (Armitage 1999). Im Wesentlichen wurden im Vergleich zur bisherigen Nomenklatur (AAP 1989) folgende Änderungen vorgenommen:

Ergänzung der Kategorie „Gingivale Erkrankungen“,  
Ersatz des Begriffes „Erwachsenenparodontitis“ durch „Chronische Parodontitis“,  
Ersatz des Begriffes „Früh beginnende Parodontitis“ durch „Aggressive Parodontitis“. Und Wegfall der „Refraktären und Rekurrierenden Parodontitis“ als eigene Kategorien.

Für Deutschland wurde die folgende Klassifikation parodontaler Erkrankungen von der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie übernommen (DGP 2002).

**Gingivale Erkrankungen**

**Chronische Parodontitis**

**Aggressive Parodontitis**

**Parodontitis als Manifestation einer Systemerkrankung**

**Nekrotisierende Parodontalerkrankungen**

**Abszesse des Parodonts**

**Parodontitis im Zusammenhang mit endodontalen Läsionen**

**Entwicklungsbedingte oder erworbene Deformationen und Zustände**

1.2.2 Chronische versus aggressive Parodontitis

Unter chronischer Parodontitis (ChP) versteht man eine infektiöse Erkrankung, die über eine Entzündung des Zahnhalteapparates zu fortschreitendem Attachment- und Knochenverlust führt. Sie ist die häufigste Form der Parodontitis und durch Taschenbildung und/oder Gingivarückgang charakterisiert. Sie kommt generell bei Erwachsenen vor, kann aber jedes Lebensalter betreffen. Mit dem Alter steigt die Häufigkeit des Auftretens und die Schwere der Erkrankung. Die bakterielle Plaque gilt als Hauptursache der Erkrankung, wobei ihre Progression durch die Wirtsabwehr bestimmt wird (Flemmig 1999). Generell ist ihre Progression langsam, akute Schübe können vorkommen. Des weiteren ist subgingivaler Zahnstein (Konkrement) vorhanden. Man unterscheidet eine lokalisierte ( $\leq 30\%$  der Zahnflächen betroffen) und eine generalisierte ( $> 30\%$  der Zahnflächen betroffen) Form. Darüber hinaus werden folgende Schweregrade unterschieden:

leichte Form: klinischer Attachmentverlust (CAL) von 1 bis 2 mm

moderate Form: klinischer Attachmentverlust (CAL) von 3 bis 4 mm

schwere Form: klinischer Attachmentverlust (CAL)  $\geq 5$  mm

Bei der aggressiven Parodontitis (AgP) werden folgende Charakteristika beobachtet (Tonetti & Mombelli 1999): Die Erkrankung zeigt einen schnell verlaufenden Attachmentverlust und Knochenabbau, bei Patienten, die sonst klinisch gesund sind. Auffällig ist auch eine familiäre Häufung dieser Erkrankung. Meist steht die Plaquemenge nicht im Zusammenhang zur Schwere der parodontalen Destruktion.

Häufig werden abnormale Phagozytenfunktion und/oder Überreaktion von Makrophagen mit erhöhten Spiegeln an PGE2 und IL-1 $\beta$  festgestellt. Die aggressive Parodontitis wird in eine lokalisierte und eine generalisierte Form mit folgenden Merkmale unterteilt:

**Lokalisierte Form:**

tritt in der Pubertät auf

hoher Serumantikörperspiegel gegen die Infektionsauslöser

Befall der ersten Molaren und Schneidezähne

**Generalisierte Form:**

meist bei Patienten unter 30 Jahren

niedriger Serumantikörperspiegel gegen die Infektionsauslöser

episodenhafter Verlauf

außer den ersten Molaren und Inzisivi sind mindestens drei weitere Zähne betroffen

### 1.3 Die orale Mikroflora

#### 1.3.1 Allgemeine Grundlagen

Die Mikroorganismen der Mundhöhle leben in einer Art Symbiose mit ihrem Wirt. Diese Harmonie kann unter besonderen Umständen gestört werden, wie z.B. bei Antibiotikabehandlung oder nach Zahnextraktion, wenn Bakterien in Bereiche eindringen, in denen sie normalerweise nicht zu finden sind. Bakterien, die bei solchen Dispositionen pathogene Wirkung ausüben können, werden auch „opportunistische Pathogene“ genannt. Parodontale Erkrankungen gehören zu den Infektionskrankheiten, die auf ein gestörtes Gleichgewicht der Zusammensetzung der residenten Mikroflora zurückzuführen sind. Seit Jahren wird diskutiert, ob die Parodontitis eine spezifische oder unspezifische bakterielle Ursache hat (Theilade 1986). Dementsprechend wurden zwei Hypothesen eingeführt:

Die unspezifische Plaquehypothese (Theilade 1986) beruht auf der Annahme, dass allein die Plaquequantität entscheidend für die Entstehung parodontaler Erkrankungen ist. Nach dieser Theorie wird qualitativ kein Unterschied zwischen bakterieller Plaque von klinisch gesunden und erkrankten Bereichen der Mundhöhle

gemacht. Die Therapie besteht aus einer umfassenden Beseitigung supra- und subgingivaler Plaque.

Die spezifische Plaquehypothese besagt, dass die Komposition der subgingivalen Mikroflora je nach Lokalisation (parodontal gesunde oder erkrankte Bereiche) oder Verlaufsform der Parodontitis (ChP, LAgP) unterschiedlich sein kann (Slots 1976, 1979) (Abb.1.2). Die Therapie basiert auf der Bestimmung der parodontalpathogenen Mikroorganismen und deren Beseitigung.

Parodontitis ist keine klassische, sondern eine opportunistische Infektion, da bisher kein spezifischer parodontopathogener Keim identifiziert wurde. Aus diesem Grund kann nicht -entsprechend den Henle-Koch'schen Postulaten- von einer spezifischen Infektion gesprochen werden (Loesche 1999). Es besteht Einigkeit darüber, dass die Initiation und Progression der Parodontitis vom Vorkommen der Mikroorganismen abhängt, die in der Lage sind, diese Erkrankung auszulösen. Die Mikrobiologie der Parodontitis ist komplex und eine parodontale Tasche kann mehr als 300 Spezies enthalten, die eine Konzentration von über  $10^8$  Bakterien pro Messpunkt erreichen kann. Aber nur wenige davon werden als parodontalpathogen bezeichnet (Moore & Moore 1994). Der Nachweis bestimmter Keime bedeutet nicht unbedingt, dass sie für die Erkrankung verantwortlich sind. Bestimmte pathogene Spezies (z.B. *Porphyromonas gingivalis*) besitzen verschiedene Klone oder genetische Subtypen, die unterschiedliche Virulenz aufweisen (Haffajee & Socransky 1994, Zambon 1996). Manche Keime kommen sowohl in parodontal gesunden als auch erkrankten Stellen vor. Das Vorhandensein von parodontalpathogenen Mikroorganismen allein ist nicht ausreichend, um die Pathogenese parodontaler Läsionen auszulösen. Die relative Menge pathogener Keime, also ihre Konzentration (z.B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Genotyp b bei  $[3 \times 10^4]$ ) (Haffajee et al. 1983), ihre Virulenz und eine geeignete Umgebung sind wichtige Voraussetzungen (Offenbacher 1996). Bakterien werden als „parodontalpathogen“ charakterisiert, wenn sie die von Socransky (1979) in Abwandlung der Henle-Koch'schen Postulate beschriebenen Kriterien erfüllen:



**Assoziation:** Erhöhtes und häufigeres Vorkommen des Parodontalpathogens bei erkrankten als bei gesunden Personen.

**Elimination:** Die Eliminierung der Mikroorganismen sollte eine Verbesserung des Krankheitsverlaufes begünstigen.

**Wirtsantwort:** Der Erreger löst beim Wirt eine Immunantwort (humoral und/oder zellulär) aus.

**Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren:** Die Mikroorganismen sollten über Stoffwechselprodukte, die zur Gewebeerstörung (z.B. Kollagenase) beitragen bzw. Faktoren, die die Zellfunktion beeinträchtigen (z.B. Leukotoxin), verfügen.

**Tiermodell:** Die Transmission des Parodontalpathogens auf Tiermodelle sollte ähnliche Erkrankungssymptome (Attachmentverluste, Knochenabbau) auslösen.

### 1.3.2 Parodontalpathogene Bakterien

Zu den am häufigsten im Zusammenhang mit parodontaler Destruktion gebrachten Erregern gehören *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* (Spirochäten) und *Prevotella intermedia* (Zambon 1996).

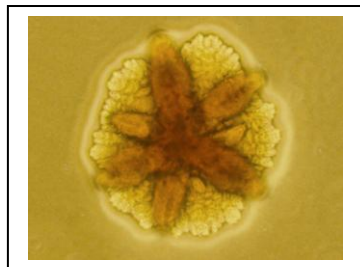


Abb. 1.3: Kolonie von AA auf TSBV-Agar (Informationsbroschüre Hain Lifescience)

#### *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA)

Im Laufe der letzten Jahre fand eine Reklassifizierung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* statt. „*Bacterium actinomycetem comitans*“ wurde von (Klinger 1912) beschrieben. Es wurde als *Actinobacillus actinomycetemcomitans* von (Topley & Wilson 1929) und als *Haemophilus actinomycetemcomitans* von Potts et al. (1985) umbenannt. Nørskov-Lauritsen & Kilian (2006) reklassifizierten *Actinobacillus actinomycetemcomitans* als *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

*A. actinomycetemcomitans* (AA) ist ein kleines, unbewegliches, gramnegatives, fakultativ anaerobes, saccharolytisches, kapnophiles Stäbchen, das bei Anzüchtung auf TSBV-Agar konvexe Kolonien mit sternförmigem Muster bildet (Abb.1.3). AA wächst schlecht in der umgebenden Luft, aber gut im 5% CO<sub>2</sub>. AA ist katalase-positiv. Untersuchungen zeigten ein erhöhtes Vorkommen des Parodontalpathogens bei der lokalisierten Form der aggressiven Parodontitis (Slots et al. 1980, Zambon et al. 1983). *A. actinomycetemcomitans* besitzt die Fähigkeit, Virulenzfaktoren zu bilden. Dazu gehören verschiedene potentiell pathogene Substanzen, u.a. das Leukotoxin (Baehni et al. 1979). Das Leukotoxin gehört zu den wichtigsten Pathogenitätsfaktoren von *A. actinomycetemcomitans*. Dieses Toxin hat ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten und spielt eine entscheidende Rolle für *A. actinomycetemcomitans* bei der Invasion von Zellen. Es wirkt toxisch für Makrophagen und menschliche Leukozyten, so dass durch das Leukotoxin in der frühen Phasen eine Beeinträchtigung der Wirtsabwehr entsteht (Haraszthy et al. 2000). Von diesem Bakterium existieren unterschiedliche Serogruppen (a, b, c, d, e, f), wobei die Serogruppenspezifität durch die Struktur der Lipopolysaccharide determiniert wird (Lakio et al. 2003). *A. actinomycetemcomitans* Serotyp b, ein hoch virulenter Klon, wurde am häufigsten bei aggressiver Parodontitis nachgewiesen (Yang et al. 2004), während Serotyp a mehr bei chronischer Parodontitis gefunden wurde (Zambon et al. 1983). Bei gesunden Patienten wurde eher Serotyp c nachgewiesen (Haffajee & Socransky 1994). Der Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* allein stellt nicht direkt ein erhöhtes Risiko parodontaler Destruktion dar, sondern die Zahl der Mikroorganismen spielt eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl von *A. actinomycetemcomitans* in aktiven Taschen höher war als in inaktiven Taschen (Haffajee et al. 1984). In einer Studie beobachteten van Winkelhoff et al. (1992), dass die systematische Therapie (Scaling und Root planing) von parodontal erkrankten Patienten mit *A. actinomycetemcomitans* in Kombination mit Antibiotika (Amoxicillin+ Metronidazol für 7 Tage) bei fast allen Patienten zur Elimination von *A. actinomycetemcomitans* und zu deutlichen Attachmentgewinnen führte. Es kann in bestimmten Fällen manchmal zu einer Rekolonisation kommen. Zur Bestimmung möglicher intraoraler ökologischer Nischen und potentieller Übertragungswege wurden populationsgenetische Analysen an *A. actinomycetemcomitans* durchgeführt (Ehmke et al. 2005). Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Persistenz der Erreger in den

parodontalen Taschen, anderen Bereichen der Mundhöhle oder auf eine Reinfektion zurückzuführen ist. *A. actinomycetemcomitans* konnte auf der Schleimhaut des Zungenrückens, dem Gaumen, der Wangenschleimhäuten und den Schleimhäuten der Tonsillen nachgewiesen werden (Müller et al. 1996, Beikler et al. 2004).

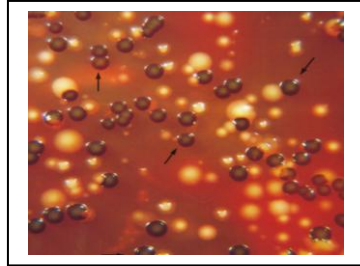


Abb.1.4: Kolonie von Pg auf Blutagar (Informationsbroschüre Hain Lifescience)

#### *Porphyromonas gingivalis* (PG)

*Porphyromonas gingivalis* ist ein gramnegatives, kurzes, anaerobes, nicht bewegliches, asaccharolytisches, kokkoides Stäbchen, das auf Blutagar braune bis schwarze Kolonien bildet (Abb.1.4). *P. gingivalis* verfügt auch über viele Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktoren, wie z.B. Proteasen, Kollagenasen, Phospholipase A, die in der Lage sind das umgebende Gewebe abzubauen oder Stoffwechselprodukte, wie z.B. Fettsäuren, Schwefelwasserstoff und Ammoniak freizusetzen, die für die umgebenden Zellen toxisch sind (Holt & Bramanti 1991). Dieser Mikroorganismus ist bei schweren Formen der chronischen Parodontitis (Slots 1979) und bei der aggressiven Parodontitis (Novak & Novak 1996) nachgewiesen worden. *P. gingivalis* kommt bei gesunden in niedrigerer Zahl und seltener vor als bei parodontal erkrankten Patienten. *P. gingivalis* wie *A. actinomycetemcomitans* können über einen spezifischen Bestandteil der äußeren Membran der Zellwand gramnegativer Bakterien, das Endotoxin Lipopolysaccharide (LPS), freisetzen und toxisch auf Fibroblasten und Leukozyten wirken sowie Knochenresorption auslösen. LPS aktiviert Makrophagen, Fibroblasten und auch Endothelzellen zur Produktion z.B. von Zytokinen (Offenbacher 1996). Diese Bakterien können schließlich in vitro und in vivo in Epithelzellen eindringen (Rudney et al. 2001) und sich somit vor der unspezifischen Immunabwehr des Wirts (Phagozytose) schützen.

### *Tannerella forsythia* (TF)

*Tannerella forsythia* (früher *Bacteroides forsythus* genannt) ist ein gramnegatives, anaerobes, spindelförmiges Stäbchen. *T. forsythia* ist in Zonen parodontaler Destruktionen häufiger als bei Gingivitis oder bei Gesunden nachzuweisen (Lai et al. 1987). In aktiven Taschen wurde *T. forsythia* auch häufiger und in größerer Menge als in inaktiven Taschen gefunden (Dzink et al. 1988). *T. forsythia* gehört mit *Porphyromonas gingivalis* und *Treponema denticola* zum „roten Komplex“. Dieser Mikroorganismus wurde besonders bei therapieresistenter Parodontitis (sog. refraktäre Parodontitis) in einer sehr hohen Zahl nachgewiesen (Listgarten et al. 1993, Haffajee & Socransky 1994).

### *Treponema denticola* (Spirochäten) (TD)

Spirochäten sind gramnegative, anaerobe, helikoidale, bewegliche Mikroorganismen. Bei Gesunden sind wenig bis keine Spirochäten zu finden, während bei Gingivitis geringe bis mittlere und bei tiefen Taschen größere Menge dieser Mikroorganismen nachgewiesen wurden. Die Zahl der Mikroorganismen steigt mit zunehmender Taschentiefe. In der Pathogenese der nekrotisierenden, ulzerierenden Gingivitis spielen Spirochäten vermutlich eine wichtige Rolle. Die Untersuchung bzw. Differenzierung der verschiedenen Spirochätenarten ist schwierig, da sie sich kaum kultivieren lassen. Bei der mikroskopischen Untersuchung von Plaqueproben wurden sie häufig nach Morphotypen (kleine, mittlere oder große Spirochäten) differenziert. *Treponema denticola* gehört zum „roten Komplex“ und wurde in Bereichen parodontaler Destruktionen häufiger als in parodontal gesunden Arealen bzw. bei Gingivitis gefunden. Das Vorkommen dieses Bakteriums ist in der subgingivalen Plaque höher als in der supragingivalen Plaque (Riviere et al. 1992). Die Rolle der verschiedenen Spirochätenarten bei der Entwicklung der Parodontitiden ist noch weitgehend ungeklärt.

### *Prevotella intermedia* (PI)

*Prevotella intermedia* ist ein gramnegatives, anaerobes und kurzes Stäbchen, das hauptsächlich bei nekrotisierender, ulzerierender Gingivitis (Loesche et al. 1982) und bei verschiedenen Parodontalerkrankungen nachgewiesen werden kann.

## 1.4 Mikrobiologische Testverfahren

Der Gebrauch unterschiedlicher mikrobiologischer Testverfahren zum Nachweis gramnegativer parodontopathogener Mikroorganismen könnte, zusätzlich zu klinischen und röntgenologischen Parametern, bei der Diagnosesicherung und bei der Therapieplanung im Rahmen der Parodontitistherapie von großer Bedeutung sein. Einige Parodontalpathogene, wie z.B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* wurden besonders häufig in Zusammenhang mit parodontaler Destruktion gebracht (Socransky et al. 1998, van Winkelhoff et al. 2002). Bei der Behandlung aggressiver Parodontitis sowie schwerer Formen der chronischen Parodontitis, die mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* assoziiert sind, konnte anhand zahlreicher Untersuchungen dargestellt werden, dass eine mechanische antiinfektiöse Behandlung der Wurzeloberflächen allein für den Therapieerfolg nicht ausreichend ist (Christersson et al. 1985, Mombelli et al. 1994, Slots & Ting 2002, Guerrero et al. 2005). Die mikrobiologische Diagnostik der subgingivalen Plaque, die zum Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* oder anderer Komplexe subgingivaler Mikroorganismen dient, ist bei der Entscheidung für den Einsatz einer zusätzlichen unterstützenden Antibiotikatherapie bzw. für die Auswahl eines geeigneten Antibiotikaregimes in der heutigen Parodontaltherapie unabdingbar. Mikrobiologische Analysen sind hauptsächlich bei aggressiven und generalisiert schweren chronischen Parodontitiden, bei Parodontitiden, die trotz vorangegangener Therapie progrediente Attachmentverluste aufweisen und mittelschweren bis schweren Parodontitiden bei systemischen Erkrankungen (z.B. HIV-Infektion) indiziert (Beikler et al. 2005). Für die Identifizierung und Quantifizierung parodontalpathogener Keime

werden überwiegend molekularbiologische Methoden kommerziell angeboten, jedoch existieren auch mikroskopische Techniken und Kulturverfahren sowie immunologische Nachweismethoden und enzymatische Bakterientests.

#### 1.4.1 Probenentnahme

Vor der Probenentnahme erfolgt keine Entfernung der supragingivaler Plaque an den für die mikrobiologische Untersuchung ausgewählten Stellen (Beikler et al. 2005). Der Bereich wird anschließend mit Watterollen und Wattepellets relativ trocken gelegt. Es werden pro Quadrant jeweils die parodontalen Taschen mit der höchsten Sondierungstiefe mit aktiven Entzündungszeichen wie Bluten und/oder Suppuration ausgewählt. Die Untersuchung von Mombelli et al. (1994) über die topographische Verteilung von AA bei ChP vor und nach Therapie zeigte, dass das Vorhandensein von AA signifikant mit der Sondierungstiefe und dem Bluten auf Sondieren assoziiert war. Mombelli et al. (1994) konnten zeigen, dass die Probenentnahme an der jeweils tiefsten blutenden Tasche eines jeden Quadranten die effizienteste Methode war, um AA mit 95% Sicherheit nachzuweisen. Subgingivale Plaqueproben können mit sterilen endodontischen Papierspitzen oder mit einer sterilen Kürette entnommen werden.

Die Papierspitzen sollten möglichst weit nach apikal in die Taschen platziert werden und für etwa 20 Sekunden belassen werden. Der Kontakt mit Zähnen, Mundschleimhaut und Speichel sollte dabei vermieden werden, um eine Kontamination zu vermeiden. Anschließend werden sie in das entsprechende Transportgefäß eingebracht.

#### 1.4.2 Direkte Mikroskopie

Die Dunkelfeld- bzw. Phasenkontrastmikroskopie ermöglicht eine Differenzierung der Bakterien nur anhand der verschiedenen Morphotypen, d.h. nach ihrer Form und Beweglichkeit. Eine Aussage über die Spezies bzw. Pathogenität der Keime ist mit diesem Verfahren nicht möglich (Listgarten & Hellden 1978). Aus der Tasche wird subgingivale Plaque entnommen, in einer Gelatinelösung oder Speichel eluiert und auf eine Trägerplatte aufgebracht. Unter dem Mikroskop werden morphologisch

Kokken, bewegliche oder unbewegliche Stäbchen, gerade und gebogene Stäbchen, Spirochäten und Filamente unterschieden und ausgezählt. Die Konturen der Bakterien zeichnen sich im Dunkelfeldmikroskop hell gegenüber ihrer Umgebung ab, im Phasenkontrastmikroskop erscheinen diese dunkel auf hellem Grund. Je nach Befund lassen sich Rückschlüsse auf Aktivität oder Inaktivität der untersuchten Tasche ziehen. Während sich in einer inaktiven Tasche überwiegend Kokken und unbewegliche Stäbchen auffinden lassen, verschiebt sich die Mikroflora einer aktiven Tasche in Richtung beweglicher Stäbchen und Spirochäten. Eine Differenzierung auf Speziesniveau ist nicht möglich. Als Entscheidungsgrundlage für eine adjuvante Antibiotikatherapie ist die direkte Mikroskopie nicht geeignet.

#### 1.4.3 Kulturverfahren

Der Einsatz von Kulturen war in der Vergangenheit die einzige Methode, entweder in Form von Gesamtkulturen oder später als Selektivkulturen, Bakterien auf Speziesebene zu identifizieren. Die klassischen bakteriologischen Kulturverfahren gelten heute noch als „goldener Standard“. Sie sind aber zeitaufwendig, technisch anspruchsvoll und werden daher nur in spezialisierten Labors durchgeführt. Diese Methode benötigt lebende Keime. Da es sich aber bei der Diagnostik parodontopathogener Mikroorganismen hauptsächlich um sauerstoffempfindliche (anaerobe) Keime handelt, müssen die Proben möglichst schnell nach der Entnahme ins Labor verschickt werden. Die Probengewinnung erfolgt mit sterilen Papierspitzen oder sterilen Küretten die anschließend in einem, mit geeignetem Transportmedium, gefüllten Probengefäß verschlossen werden. Die Weiterverarbeitung erfolgt mittels aerober und anaerober Kulturtechniken auf verschiedenen Selektivnährmedien (z.B. Trypticase Soy Broth with Bacitracin and Vancomycin: TSBV-Agarplatte). Nach der Kultivierung werden Bakterienkolonien, die morphologisch parodontopathogenen Mikroorganismen ähneln, gezählt und mittels Subkultivierung identifiziert. Bis zum endgültigen Ergebnis können mehrere Wochen vergehen. Vorteile von Kulturverfahren sind einerseits das Erfassen eines breiten Spektrums von Mikroorganismen, andererseits die Bestimmung der Empfindlichkeit verschiedener Bakterienstämme gegenüber Antibiotika sog. Resistenztestung (Sanz et al. 2004).

#### 1.4.4 Immunologische Methoden (Antigen-Antikörper-Reaktionen)

Bei dieser Gruppe von Verfahren erfolgt die Bestimmung von Bakterien mit Hilfe spezifischer mono- oder polyklonaler Antikörper (Ak), die sich an spezie-spezifischen Antigenen (Ag) anheften können. Die entstehenden Ag-Ak-Komplexe werden durch zusätzliche Bindung von enzymartigen Farb- oder Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht. Verschiedene Techniken wurden in der Literatur beschrieben: direkte oder indirekte Immunfluoreszenz, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), Zytofluorographie, Membranverfahren und Latexagglutination (Greenstein 1988, Lamster et al. 1993, Sanz et al. 2004).

- Immunfluoreszenz: Die Methode der Immunfluoreszenzmikroskopie basiert auf Ag-Ak-Komplexbildung, die durch Koppelung mit Fluoreszenzfarbstoffen (fluoreszierende Enzyme) unter UV-Licht sichtbar werden (Gmür & Guggenheim 1994).

- ELISA: Bei diesem Test (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) wird ein Ag-Ak-Komplex über eine Enzym-Farbstoff-Reaktion sichtbar gemacht. Durch photometrische Bestimmung der enzymatischen Aktivität oder visuell über eine kolorimetrische Reaktion können Bakterien nachgewiesen und quantitativ erfasst werden.

#### 1.4.5 enzymatischer Bakterientest

Ein in der Praxis („chair side“) einfach und schnell durchführbares Verfahren war der BANA-Test (z.B. Dentocheck; Butler). Dieses Verfahren basierte auf dem Nachweis eines trypsinähnlichen Enzyms (Peptidase), über das bestimmte parodontalpathogene Mikroorganismen, wie *T. denticola*, *P. gingivalis* und *T. forsythia*, verfügen. Diese Peptidase ist in der Lage das Substrat BANA (N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginin-2-naphtylamid) zu hydrolysieren (Loesche et al. 1992). Die durch die Reaktion entstandene Blaufärbung des Teststreifens wies das Vorkommen des Enzyms und damit der Mikroorganismen nach. *A. actinomycetemcomitans* ließ sich mit dem BANA-Test nicht nachweisen, da dieses Bakterium dieses Enzym nicht aufweist. Eine Differenzierung und Quantifizierung der drei oben genannten Bakterienarten war ebenfalls nicht möglich. Aufgrund der begrenzten



Aussagefähigkeit, der niedrigen Sensitivität und Spezifität (Perioscan®) steht dieser Test kommerziell nicht mehr zu Verfügung (Sanz et al. 2004).

#### 1.4.6 Molekularbiologische Methoden

Die Entwicklung molekularbiologischer Techniken zum Nachweis parodontopathogener Mikroorganismen erweiterte nicht nur unsere Kenntnisse in der mikrobiologischen Genetik, sondern schuf auch die Grundlagen für die Entwicklung von verbesserten Nachweisverfahren für die klinische Praxis (Saiki et al. 1988, Gibbs 1990). Die molekularbiologischen Techniken basieren auf der Analyse von bakterieller chromosomaler DNS (Desoxyribonukleinsäure) oder ribosomaler RNS (Ribonukleinsäure) (Dawson et al. 1996). Die gesamte bakterielle genetische Information ist auf einem einzigen, ringförmigen Chromosom (Plasmid) in Form von doppelsträngiger DNS gespeichert. Die Kette ist mit 1 mm Länge und etwa 10<sup>6</sup> Basenpaaren relativ kurz. Bakterien haben 70 Svedberg (S) große Ribosomen, die aus einer 30S- und einer 50S-Untereinheit bestehen. Ein Teil der 30S-Untereinheit ist die 16S-rRNS, die aus etwa 1500 Nukleotiden besteht. Einige Nukleotidsequenzen der 16S-rRNS sind speziesspezifisch. Es ist daher wichtig, bakterielle DNS bzw. RNS aus der Plaqueprobe zu isolieren und für Parodontalpathogene spezifische Sequenzen darauf markieren zu können. Viele Bakterienarten besitzen ähnliche, partiell identische DNS-Abschnitte, jedoch existieren Basensequenzen die speziesspezifisch sind. Nach Isolierung und Reinigung der DNS stehen verschiedene diagnostische Methoden zum Nachweis und je nach Verfahren zur Quantifizierung parodontopathogener Mikroorganismen zur Verfügung.

##### 1.4.6.1 Nukleinsäure-Sonden (DNS- bzw. Oligonukleotid-Sonden)

Nach Isolierung der bakteriellen DNS wird diese in zwei Einzelstränge aufgetrennt und fragmentiert. Sind bei dem zu untersuchenden Mikroorganismus charakteristische Basensequenzen der Ziel-DNS schon bekannt, dann werden spezifische, komplementäre, radioaktiv oder enzymatisch markierte Gensonden (DNS oder RNS) zum Nachweis dieses Mikroorganismus eingesetzt. DNS-Sonden binden an den komplementären Abschnitt der bakteriellen DNS und hybridisieren mit dieser. Alle Hybridisierungsmethoden benutzen radioaktiv oder fluoreszierend

gekennzeichnete DNS-Sonden, um, nach der Bindung an die Ziel-DNS, eine Visualisierung zu ermöglichen (Loesche 1992, Dawson et al. 1996, Tanner et al. 1998). Je nach Länge der Nukleotidfolge unterscheidet man gesamtgenomische DNS-Sonden (ca. 25000 Nukleotide), geklonte Plasmidsonden (ca. 1000 Nukleotide) und Oligonukleotidsonden (20 – 30 Nukleotide). Um Kreuzreaktionen mit anderen nicht gesuchten Mikroorganismen aus der Plaqueprobe, die die Sensitivität und Spezifität eines Tests reduzieren, zu vermeiden, werden zur Zeit überwiegend Oligonukleotidsonden verwendet (Dawson et al. 1996). Oligonukleotidsonden sind komplementär zu bestimmten Sequenzen der ribosomalen 16S rRNS (Teil der kleinen Untereinheit der bakteriellen Ribosomen) verschiedener Bakterien und ermöglichen somit ihre Identifizierung. Diese Methoden besitzen eine hohe Sensitivität sowie Spezifität gegenüber anderen Testverfahren (van Steenberghe et al. 1999, Savitt et al. 1988) und benötigen im Gegensatz zu kulturellen Techniken keine lebenden Keime.

#### 1.4.6.2 Checkerboard DNS-DNS Hybridisierungstechnik

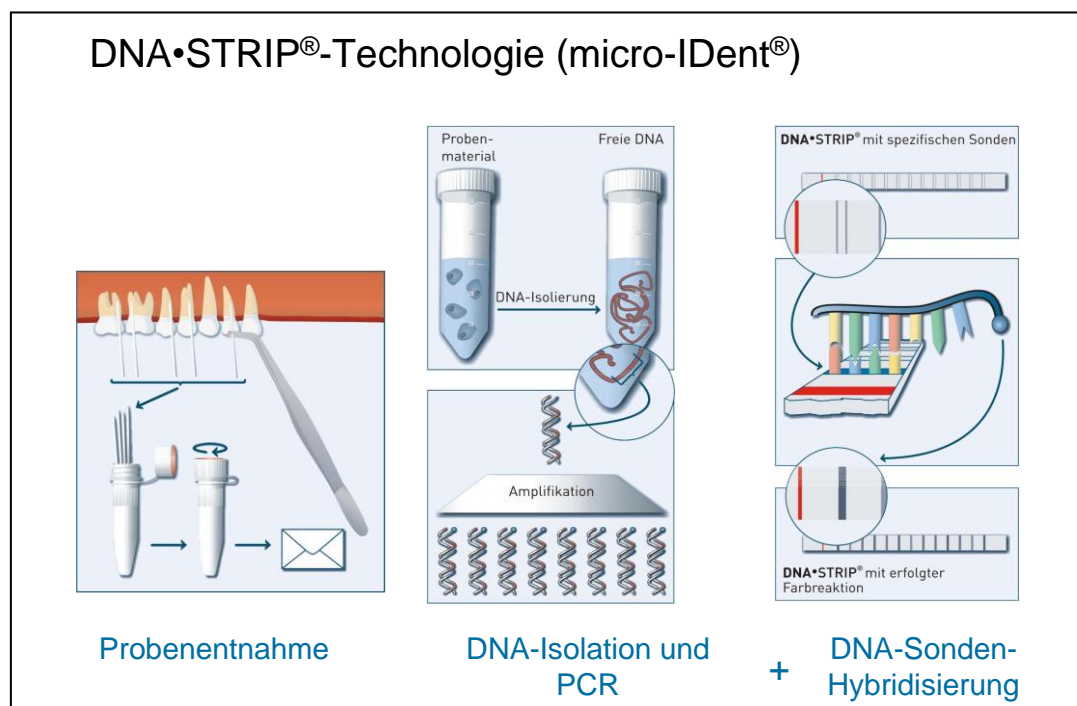
Diese Technik wurde von Socransky et al. 1994 zum Nachweis von mehr als 40 in der Mundhöhle häufig vorkommenden Mikroorganismen entwickelt (Socransky et al. 1994). Dieses Verfahren bedient sich zur Hybridisierung von DNS-Proben gesamtgenomischer, Digoxigenin-DNS-Sonden oder 16S rRNS-Oligonukleotidsonden, die auf eine Trägermembrane aufgebracht werden. Sie ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Bakterienspezies in einer oder mehreren Plaqueproben. Diese hochspezifische Methode kann nur in speziell eingerichteten Labors durchgeführt werden und verlangt bestimmte Fachkenntnisse. Sie steht dementsprechend nicht für den Routineneinsatz zur Verfügung, sondern wird z.B. bei epidemiologischen Untersuchungen verwendet. Diese Technik bedarf nicht des Vorliegens lebender Mikroorganismen, dadurch steht das Problem des Probenverkehrs im Hintergrund.

#### 1.4.6.3 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Diese vereinfachte und weitgehend automatisierte Methode, die 1985 entwickelt wurde, ermöglicht innerhalb weniger Stunden die selektive Amplifizierung einer

bestimmten DNS-Sequenz auf eine hohe Kopienzahl (Dawson et al. 1996, Sanz et al. 2004). Die Polymerasekettenreaktion beginnt zuerst mit der Isolierung der bakteriellen DNS; DNS-Doppelstränge, die dann durch Erhitzen in zwei einzelne Stränge getrennt werden (Denaturierung). Anschließend erfolgt bei dieser Temperatur die Anlagerung spezifischer Oligonukleotidprimer an den jeweils beiden 3'-Enden der komplementären genomischen Sequenzen (Hybridisierung oder Annealing). Als Primer dienen ca. 15-25 Basen lange Oligonukleotide, so genannte 16S rRNS-Sonden, die komplementär zu den bereits bekannten flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden DNS-Sequenzen synthetisiert werden. Die Extension oder Elongation erfolgt mit Hilfe einer hitzestabilen DNS-Polymerase, die die zwischen den Primern gelegenen genomischen DNS-Matrizen amplifizieren kann. Es handelt sich um eine Taq-Polymerase aus dem Bakterium „*Thermus aquaticus*“, die 1988 entwickelt wurde (Saiki et al. 1988). Durch ihre Thermostabilität ist eine erneute Gabe dieses Enzyms zwischen den Replikationszyklen nicht erforderlich. Durch Wiederholung dieses Prozesses (30 bis 40 mal) aus Denaturierung, Hybridisierung und Extension kann die exponentielle Amplifikation der Ausgangssequenz erzielt werden, bis die Zielsequenz zum Nachweis ausreichend vervielfältigt wurde. Die amplifizierte DNS-Sequenz kann nun mittels Elektrophorese in Agarose mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden (Neumaier et al. 1998). Die Polymerasekettenreaktion (PCR) besitzt eine sehr hohe Sensitivität sowie Spezifität. Als Vorlage reicht sogar eine einzige Kopie der DNS-Zielsequenz aus (Greenstein 1988). Diese Methode hat aber einige Einschränkungen, z.B. bei der Untersuchung von geringen DNS-Mengen können notwendige Bestandteile einer PCR (Primer, dNTPs, Taq-Polymerase) schon aufgebraucht sein, bevor genügend Zielsequenz produziert wurde (Sanz et al. 2004). Um einige dieser Nachteile auszugleichen, wurden in den letzten Jahren verschiedene PCR-basierte Methoden entwickelt. Die Multiplex-PCR erlaubt z.B. mit dem Einsatz mehrerer 16S rRNS gerichteter Primer den Nachweis verschiedener Spezies in einer einzigen PCR-Reaktion (Henegariu et al. 1997, Garcia et al. 1998). Die Bemühungen um die quantitative Bestimmung der Bakterien führten zu der Entwicklung der Real-Time-PCR-Methode (z.B. micro-IDent<sup>®</sup>, Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren). Bei dieser Methode handelt es sich um eine modifizierte PCR, mit der die Spezifität und Sensitivität weiter erhöht wird und eine quantitative Aussage hinsichtlich der in der Probe vorhandenen Bakterien möglich ist. Diese Methode identifiziert die sechs

Parodontalpathogene *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* ssp., und *Prevotella intermedia*. Standard-PCR-Methoden erlauben keine präzise Quantifizierung, da nur eine Endpunktbestimmung möglich ist. Dadurch ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sehr gering. Real-Time-PCR löst dieses Problem, in dem die zunehmende Menge an PCR-Produkten direkt kontrolliert wird. Dies geschieht durch die Anwendung einer artspezifischen, fluoreszenzmarkierten Sonde zusätzlich zu den speziesspezifischen Primern: der TaqMan®-Sonde, die innerhalb der gesuchten Gensequenz bindet. Während der DNS-Amplifizierung wird diese Sonde durch die 5' Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Es werden Fluoreszenzsignale freigesetzt, die zur Quantifizierung der Bakterienzahl ausgewertet werden. Die Stärke des Fluoreszenzsignals ist proportional der Anzahl der DNS-Kopien. Die Verwendung fluoreszenzmarkierter Sonden ermöglicht es, die Vervielfältigung der DNS direkt und kontinuierlich per Computer aufzuzeichnen. Die Bestimmung der Bakterienzahlen findet nicht am Endpunkt, sondern zu Beginn der exponentiellen Phase statt, so dass eine exakte Quantifizierung der Erregerzahlen in der Ausgangsprobe möglich ist.



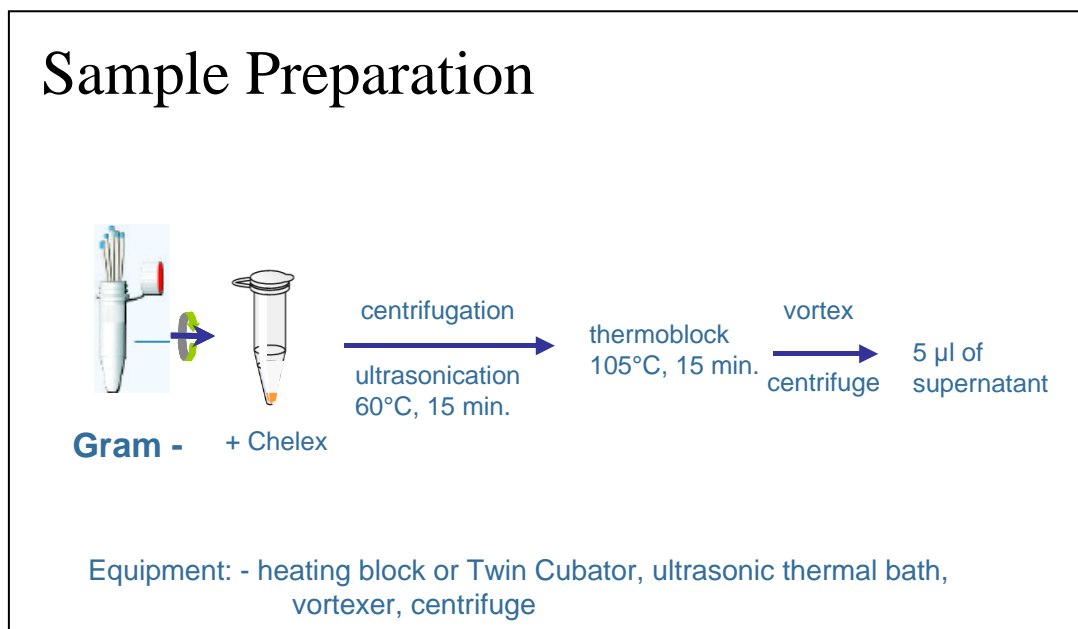
**Abb.1.5: Technischer Ablauf des Testverfahrens micro-IDent®, Hain Life Science.**  
(Informationsbroschüre Hain Lifescience)

Die DNS-Strip-Technologie nutzt einen anderen Lösungsansatz:

Bei diesem Verfahren werden die Bakterien nach der Probenentnahme aus der Papierspitze extrahiert und mittels PCR vervielfältigt. In einem nachfolgenden Schritt erfolgt dann eine Hybridisierung mit Biotin-markierten bakterienspezifischen Sonden, die fest an eine Membran gebunden sind (Abb.1.5). Das heißt, wir haben hier eine doppelte Selektion:

- 1.) nur passende DNS wird vervielfältigt
- 2.) in der Hybridisierung binden wiederum nur passende Amplifikate an die Sonden: falsch-positive Ergebnisse sind praktisch ausgeschlossen.

Semiquantitative Bestimmung über Bandenintensität.



**Abb.1.6:Analysevorbereitung der gesammelten Proben (Informationsbroschüre Hain Lifescience**

Die meisten parodontalpathogenen Bakterien sind gram-negativ. Sie sind charakterisiert durch eine dünne Zellwand, was es relativ einfach macht diese aufzulösen. Die DNS-Isolation kann dann unter Zuhilfenahme eines wenig aufwendigen Protokolls durchgeführt werden.

Als erstes wird eine Extraktionslösung sowie Chelex dem Behälter mit den Papierspitzen hinzugefügt. Danach kommt der Behälter in eine Zentrifuge und anschließend für 15 min. in ein 60°C warmes Ultraschallbad. Nach weiteren 15 min. bei 105°C im Ultraschallbad ist das Protein denaturiert. Es erfolgt eine erneute

Zentrifugation, danach kann die isolierte Bakterien-DNS zur weiteren Analyse verwendet werden (Abb.1.6).

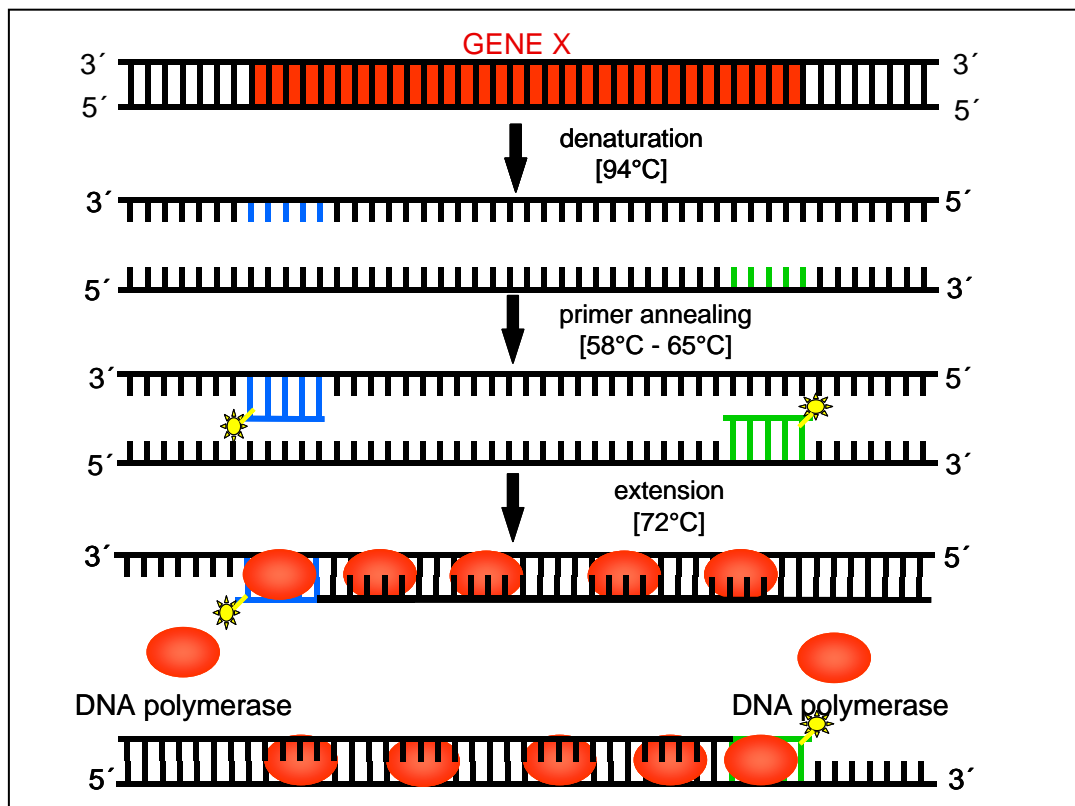


Abb. 1.7: Schematischer Ablauf der PCR-Reaktion (Informationsbroschüre Hain Lifescience)

Was passiert bei der PCR- Reaktion?

Im ersten Schritt wird der DNS – Doppelstrang separiert. Die Wasserstoffbindungen, die den Strang zusammenhalten, werden mittels thermaler Denaturierung aufgelöst. Nun können speziell entwickelte Primer, welche mit Biotin markiert sind, bei einer Temperatur von 58 – 65°C an die Einfachstränge andocken.

Bei einer Temperatur von exakt 72°C kann die Polymerasereaktion jetzt optimal ablaufen. Durch Zugabe von passenden Nukleotiden zu dem Primer kann der Gegenstrang jetzt Schritt für Schritt aufgebaut werden (Abb.1.7).

Nach Abschluss eines PCR-Kreislaufes hat sich die Menge der DNS-Stränge verdoppelt und aufgrund der Verwendung der markierten Primer ebenfalls die speziell aufgebauten biotinmarkierten Stränge, die eine wichtige Voraussetzung für die folgenden Schritte sind.

In der Multiplex-PCR werden nun alle für die zu untersuchenden Bakterien spezifischen Primer simultan der Reaktionsmischung hinzugefügt. Dies erlaubt nun eine parallele Reaktion aller zu bestimmenden Keime.

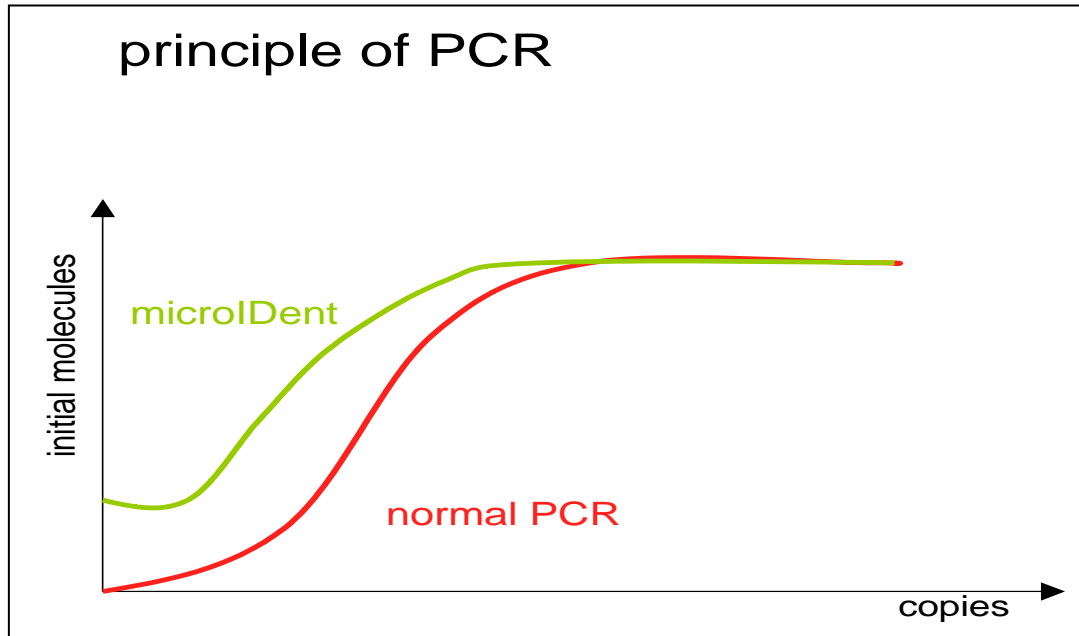


Abb. 1.8: Graphische Darstellung der Reaktionssensibilität (Informationsbroschüre Hain Lifescience)

Theoretisch besteht die Möglichkeit, ein einziges DNS-Molekül zu bestimmen und zu amplifizieren. Dies kann wichtig sein bei der Argumentation spezifischer Krankheitssymptomatiken, die schon von geringen Bakterienmengen abhängig sind. Bei der Parodontitis z.B. würde es aber keinen Sinn haben, einzelne Bakterien zu analysieren, denn auch bei parodontal gesunden Patienten findet man eine bestimmte Anzahl pathogener Keime, die aber aufgrund ihrer geringen Menge keine klinische Relevanz besitzen.

Deswegen wurde die Reaktionssensibilität so adjustiert, dass nur DNS über einem bestimmten Level analysiert wird. Dieser liegt für AA bei  $10^3$  Molekülen und  $10^4$  Moleküle für die anderen parodontalen Pathogene (Abb.1.8).

Dies bedeutet dann aber, dass jedes positive Ergebnis automatisch eine therapeutische Relevanz hat.

Um die amplifizierte DNS weiter zu spezifizieren und die Resultate dann auch sichtbar zu machen, verwendet man die sogenannte „reverse hybridization“ als Testverfahren.

## Denaturation Separation in Single Stranded DNA

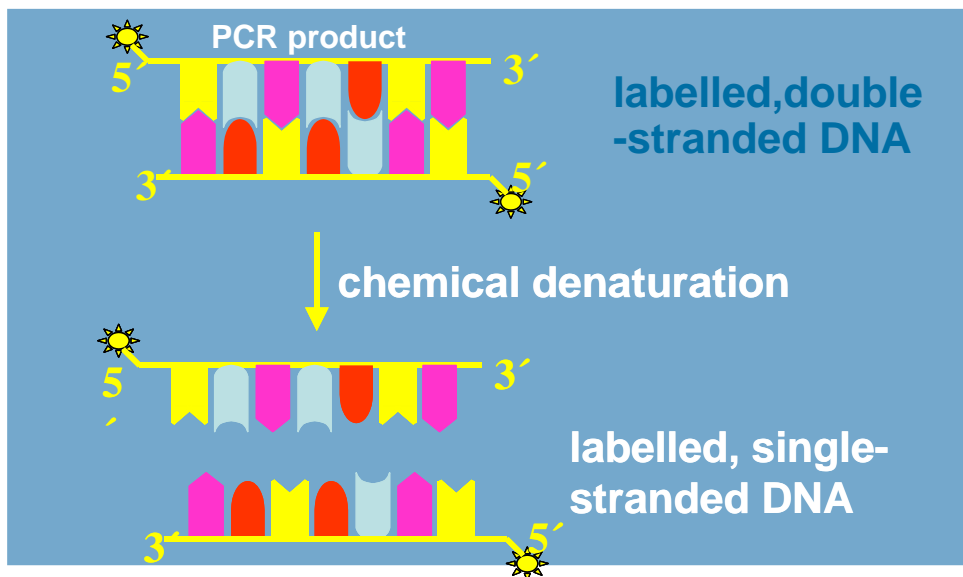


Abb. 1.9: Chemisch induzierte Denaturation (Informationsbroschüre Hain Lifescience)

Während der “reverse hybridization” werden die biotinmarkierten doppelsträngigen PCR Produkte erneut in einfachsträngige Moleküle separiert. Dies wird in diesem Fall durch eine chemische Reaktion induziert (Abb.1.9).

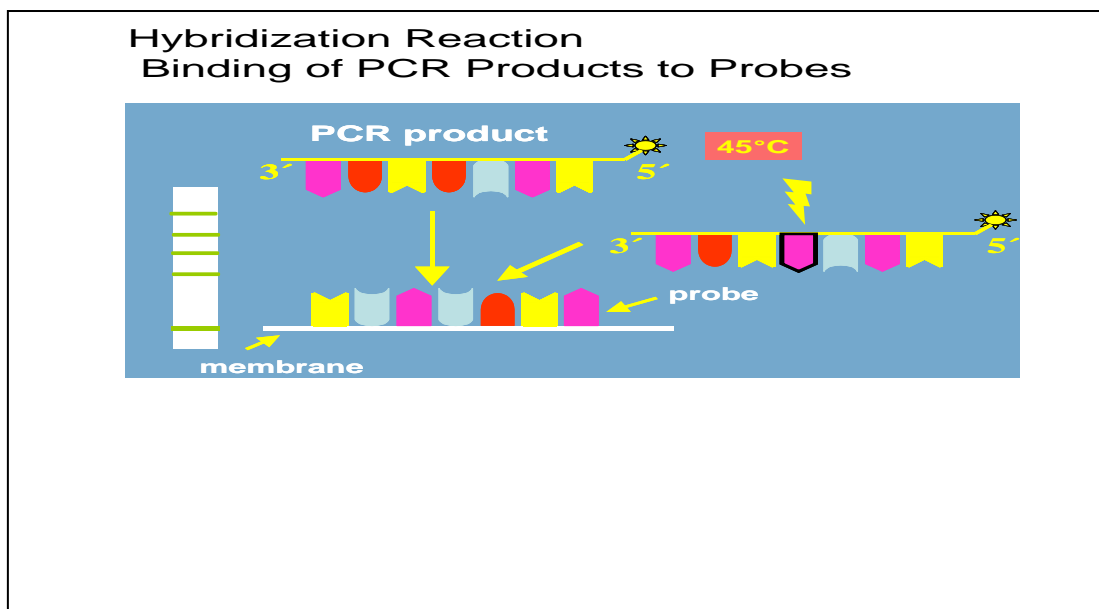


Abb. 1.10: Bindung der Proben mit den PCR-Produkten (Informationsbroschüre Hain Lifescience)

Jetzt werden alle einzelsträngigen PCR-Produkte (amplicons) einer Membran zugeführt. Auf dieser Membran sind bakterienspezifische Zielsequenzen kovalent



gebunden. Die Zielsequenzen für AA sind an einer bestimmten Stelle, die für Pg an einer anderen fest definierten Stelle und so weiter für alle weiteren Spezies.

Die Zielsequenzen sind ebenfalls einzelsträngig und können aus diesem Grund mit ihrem entsprechenden Gegenpart eine Bindung eingehen (Abb.1.10).

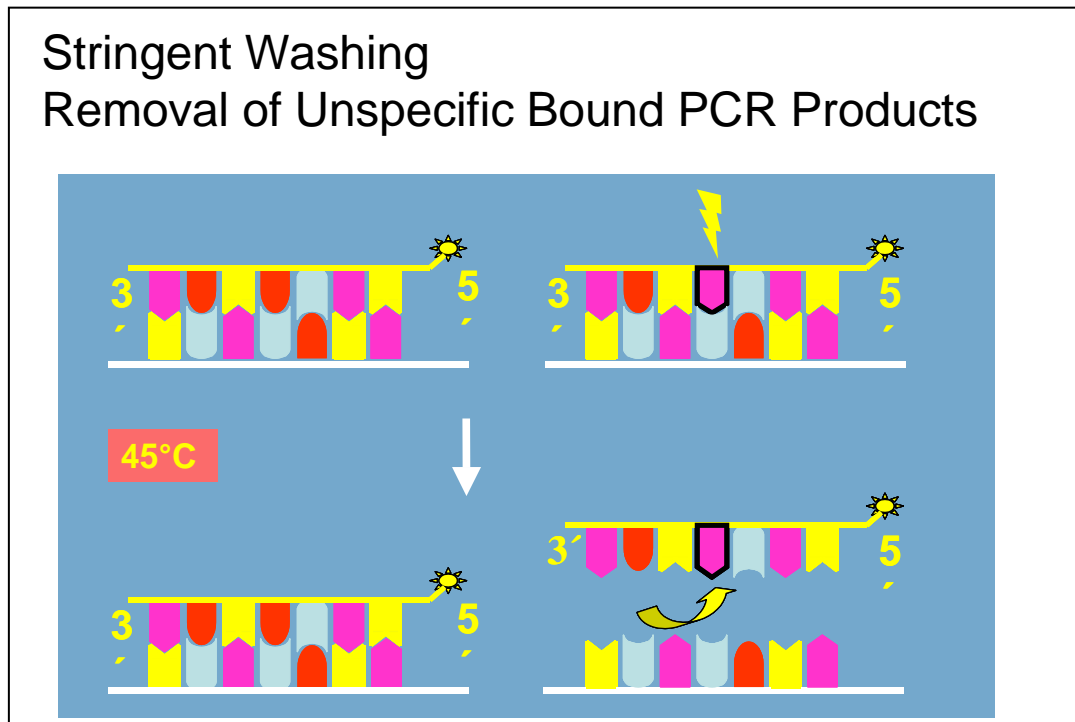
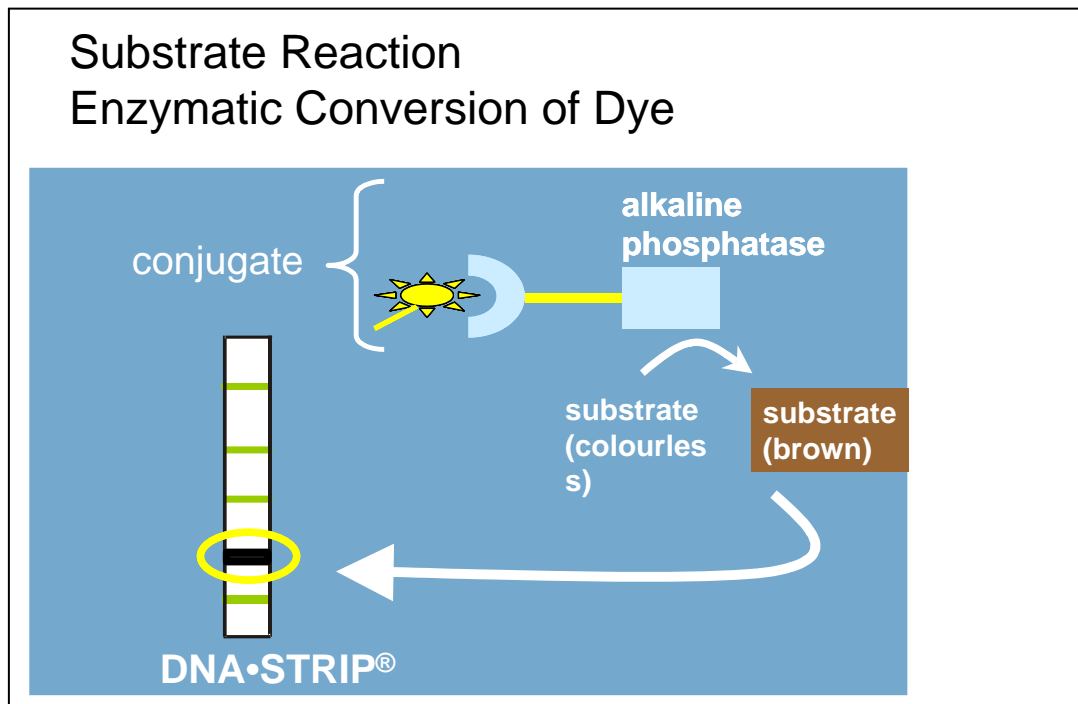


Abb. 1.11: Entfernung der unspezifischen Bindungen (Informationsbroschüre Hain Lifescience)

Unter Zuhilfenahme von bestimmten Temperaturen und speziellen chemischen Substanzen werden nur die Bindungen erhalten, bei denen eine exakte Übereinstimmung besteht, alle anderen werden abgespült (Abb.1.11).



**Abb.1.12:Färbung durch enzymkatalysierte Reaktion (Informationsbroschüre Hain Lifescience)**

Das Resultat sind biotinmarkierte DNS Stücke, welche amplifiziert wurden von der DNS der parodontalen Bakterien aus den Originalproben.

Diese DNS Fragmente sind kovalent an eine Membran gebunden und sollen nun sichtbar gemacht werden. Um dies zu erreichen, wird eine spezielle Mischung aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase auf die Membran gegeben.

Streptavidin ist ein Molekül, das spezielle Bindungen mit biotinmarkierten Stellen ausbildet. Das Enzym alkalische Phosphatase katalysiert eine chemische Reaktion die zu einer Braunfärbung führt (Abb.1.12).

Diese braune Zonen sind dann auf den Membranstreifen zu sehen. Sie sind der Indikator, welche Bakterien in der Originalprobe vorhanden waren und welche nicht (Abb.1.13).

# Hybridisierung



Substratinkubation



Evaluation

Abb. 1.13: Sichtbare Färbung als Indikator der Bakterien der Originalprobe  
(Informationsbroschüre Hain Lifescience)

Am Ende werden die sich auf der Membran abzeichnenden Braunfärbungen mit einer Referenzschablone verglichen und evaluiert (Abb.1.14).

Die Färbung zeigt an, dass ein bestimmtes Bakterium vorhanden ist. Die Konzentration bzw. die Menge errechnet sich aus der Intensität der abgezeichneten Linie. Hierbei handelt es sich um eine semiquantitative Analyse.

## Evaluation

Conjugate Control →  
Amplification Control →  
*A. actinomycetemcomitans* (Aa) →  
*Porphyromonas gingivalis* (Pg) →  
*Prevotella intermedia* (Pi) →  
*Tannerella forsythia* (Tf) →  
*Treponema denticola* (Td) →

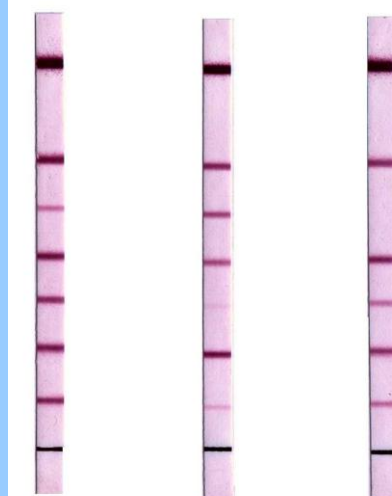


Abb.1.14:Evaluation mit Hilfe eines Referenzstreifens (Informationsbroschüre Hain Lifescience)

## 1.5 Hypothesen

Bei der Auswertung subgingivaler Plaqueproben mittels semiquantitativer PCR von den jeweils tiefsten Stellen eines Sextanten werden Parodontalpathogene häufiger bzw. in höheren Zahlen nachgewiesen als bei Auswertung der Proben von den tiefsten Stellen jedes Quadranten.

## 1.6 Ziele dieser Studie,

Vergleich von Nachweishäufigkeit und Keimzahl nach Auswertung von gepoolten subgingivalen Plaqueproben mittels semiquantitativer PCR aus den tiefsten Taschen jedes Quadranten (MT4) bzw. Sextanten (MT6).

Zielgrößen

- 1) **Nachweis der Bakterien**
- 2) **Semiquantitative Klassifikation (Klassen 0-4) der untersuchten Bakterien**

## **2 Material und Methode**

### **2.1 Patienten**

Es wurden 50 Patienten, die sich zur systematischen Parodontitistherapie in der Praxis von Dr. Matthias Mayer, MSD, Arndtstr. 14, 60325 Frankfurt vorstellten und bei denen eine aggressive oder generalisierte schwere chronische Parodontitis diagnostiziert wurde, für diese Studie rekrutiert. Dabei wurden diese klinischen Diagnosen wie folgt definiert (Kim et al. 2006, Schacher et al. 2007):

2.1.1 Aggressive Parodontitis: Patient ist klinisch gesund, d.h. es liegen keine Grunderkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) vor, die für Parodontitis prädisponieren; röntgenologischer Knochenabbau  $\geq 50\%$  an mindestens 2 verschiedenen Zähnen; Alter  $\leq 35$  Jahre.

2.1.2 Generalisierte schwere chronische Parodontitis: Attachmentverluste  $\geq 5$  mm an mehr als 30% der Stellen; Alter  $\geq 35$  Jahre.

#### **2.1.3 Einschlusskriterien:**

- Alter ab 18 Jahre
- klinische Diagnose einer aggressiven oder generalisiert schweren chronischen Parodontitis
- mindestens 5 Zähne pro Quadrant
- schriftliche Einverständniserklärung

#### **2.1.4 Ausschlusskriterien:**

- Grunderkrankung oder Zustand (z.B. Herzklappenersatz), die für Maßnahmen, die transitorische Bakteriämien auslösen (z.B. Erhebung von ST und PAL-V, Entnahme subgingivaler Plaqueproben), eine antibiotische Abschirmung erforderlich machen
- systematische nichtchirurgische und/oder chirurgische Parodontitistherapie während der letzten 12 Monate vor subgingivaler Probenentnahme
- Einnahme systemischer oder subgingivale Applikation lokaler Antibiotika während der letzten 6 Monate vor subgingivaler Probenentnahme

### 2.1.5 Einverständniserklärung

Alle Patienten wurden vor der klinischen Untersuchung ausführlich über das Vorgehen sowie über mögliche Risiken der Studie aufgeklärt. Des Weiteren mußten die Teilnehmer ihr schriftliches Einverständnis erklären.

Für diese Studie lag unter der Nummer 189/07 ein Votum der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität vor.

## 2.2 Klinische Untersuchung

Die Sondierungstiefen (ST) und vertikalen Attachmentlevel (PAL-V) wurden an 6 Stellen pro Zahn (mesiobukkal = mb, bukkal = b, distobukkal = db, mesiopalatal = mp, palatal = p, distopalatal = dp) mit einer standardisierten einfachen manuellen Parodontalsonde (PCPUNC 15, Hu Friedy, Chicago, USA) auf 1 mm genau gemessen. 30 Sekunden nach Sondierung wurde Bluten auf Sondieren (BOP) beurteilt.

## 2.3 Entnahme der subgingivalen Plaqueproben und angewandtes Testverfahren

Bei allen Patienten fand die mikrobiologische Probenentnahme unmittelbar vor antiinfektiöser Therapie oder zumindest innerhalb von 4 Wochen nach klinischer Befunderhebung statt. Für die Probenentnahme wurde die supragingivale Plaque nicht entfernt (Beikler et al. 2006).

Für die Probenentnahme wurden jeweils die parodontalen Taschen mit der höchsten Sondierungstiefe eines jeden Quadranten ausgewählt. Existierten in einem Quadranten mehrere Stellen mit der gleichen Sondierungstiefe, so wurde die Stelle mit dem stärksten Attachmentverlust gewählt. Existierten mehrere solche Stellen mit gleichem Attachmentverlust, wurde die Stelle gewählt, die Zeichen einer aktiven Entzündung, wie Bluten auf Sondieren oder Suppuration, aufwies.

Nach relativer Trockenlegung mittels Watterollen wurden jeweils 2 sterile Papierspitzen gleichzeitig an den ausgewählten Stellen nach subgingival platziert und für 20 Sekunden belassen (Abb.2.1). Anschließend wurde jeweils eine

Papierspitze von jeder Stelle in eines von 2 Transportgefäßen gegeben, so dass für denselben Patienten 2 gepoolte Proben von denselben Stellen entstand (MT4) (Abb.2.2). Anschließend wurden von den tiefsten Stellen jedes der bisher nicht berücksichtigten Sextanten mittels jeweils einer Papierspitze in der oben beschriebenen Weise Plaqueproben entnommen. Diese beiden Papierspitzen wurden in eines der beiden Transportgefäße gegeben (MT4→MT6).



**Abb. 2.1:**  
Probenentnahme mit zwei  
Papierspitzen

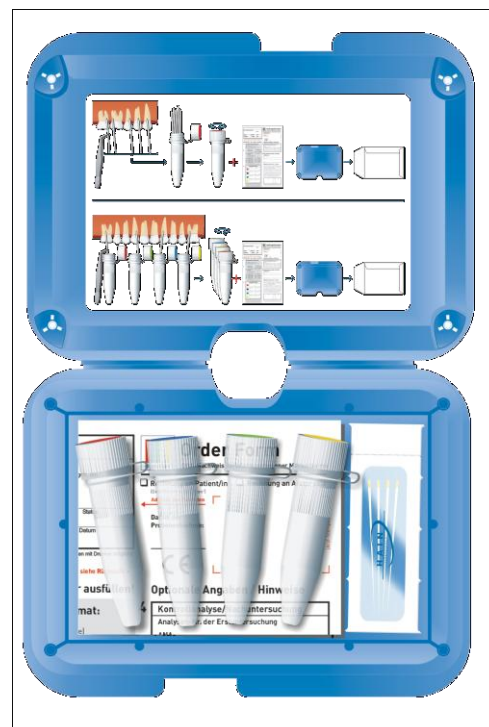


**Abb. 2.2:**  
Einbringen der Papierspitzen in zwei verschiedene  
Transportgefäße

Zur Auswertung für das Vorliegen von *A. actinomycetemcomitans* (AA), *T. forsythia* (TF), *P. gingivalis* (PG), *Prevotella intermedia* (PI) und *T. denticola* (TD) mit einem kommerziellen PCR-DNS-Sondentest (micro-IDent®plus, Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren) (Abb. 2.3, 2.4, 2.5) werden die Proben verschickt. Der micro-IDent®plus basiert auf der DNS-STRIP-Technologie. Die Nachweisgrenze dieses Tests liegt bei  $10^3$  für AA und  $10^4$  für die anderen Keime.

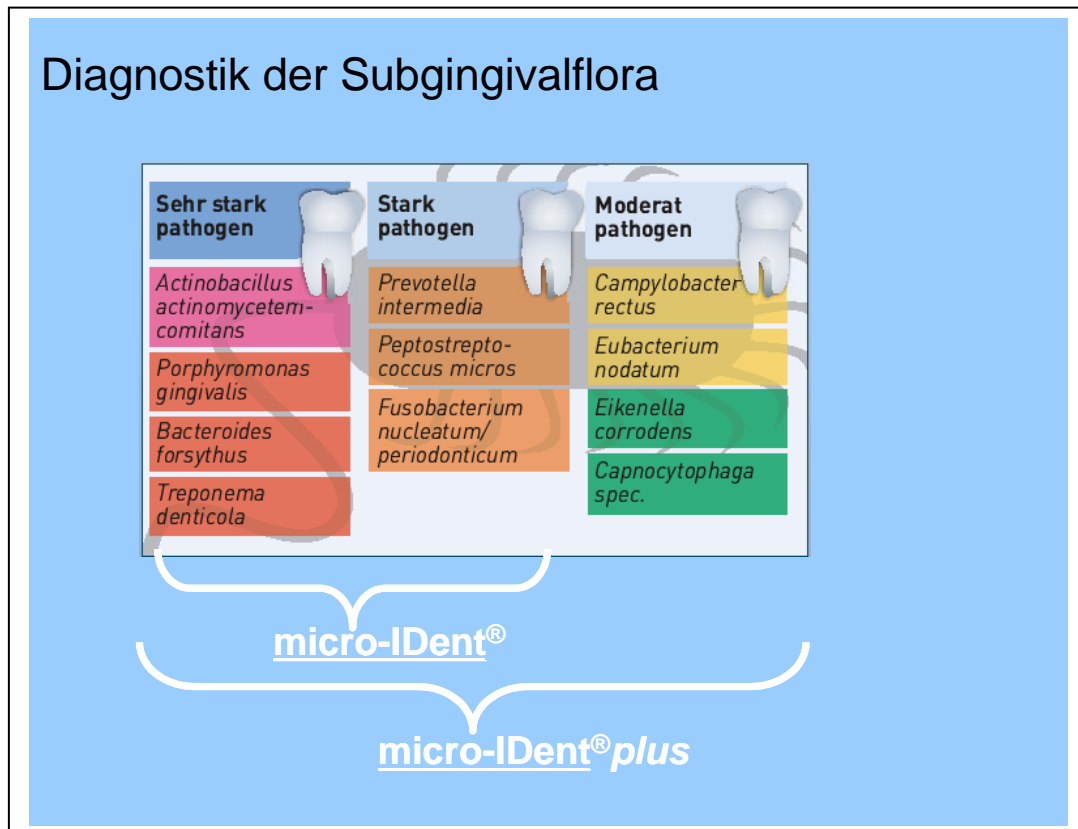


**Abb. 2.3:**  
Test-Kit micro-IDent® und  
micro-IDent®plus



**Abb. 2.4:**  
Kit geeignet für gepoolten und/oder separaten  
Test







**Abb. 2.5:**

Mit dem Basis-Test micro-Ident sind die fünf sehr stark pathogenen Keime AA, Pg, Tf und Td sowie Pi nachweisbar. Das Upgrade micro-Ident® plus weist 6 weitere Bakterien mit nachgewiesenem parodontalpathogenen Potential nach. Dazu gehören: Pm., Fn, Cr, En, Ec und *Capnocytophaga* Spezies.

(Informationsbroschüre Hain Lifescience)





**Ergebnismitteilung micro-Ident® plus**  
 DNA-Nachweis von 11 parodontopathogenen Markerkeimen

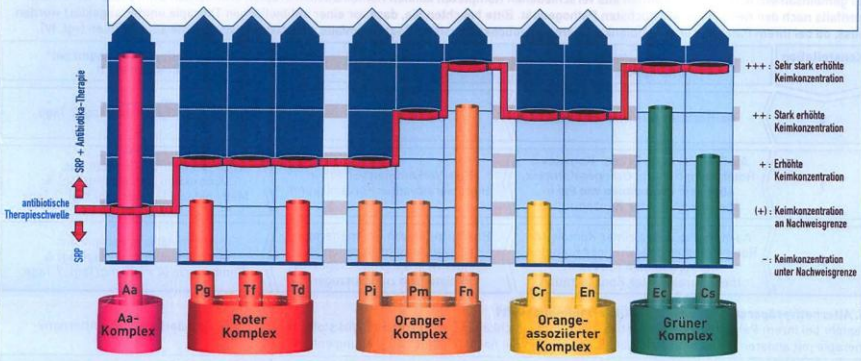
Hain Lifescience GmbH | Postfach 43 | D-72147 Nehren

**Dr. med. dent. M. Mayer M.S.D.**  
 Arndtstrasse 14  
 60325 Frankfurt

<b>Patient</b>	
<b>Geburtsdatum</b>	01.01.1974
<b>Probe</b>	2-Stellen-Probe / Probe 1 von 2
<b>Analyse</b>	Erstanalyse
<b>Analysen-Nr.</b>	ANA230436/49
<b>Analysendatum</b>	03.09.2007
<b>Zahn / Zähne</b>	ROT/MT4-18/28/37/47
<b>Maximale Taschentiefe</b>	12mm

**Ergebnis**

Die mikrobiologische Analyse für **Aa-Komplexes (Aa)** . In Abhängigkeit vom klinischen Bild kann dies zusätzlich zur mechanischen Therapie (SRP) eine adjuvante Antibiotika-Behandlung (**Keimkonstellation 1**) erfordern. Zur Beurteilung des Therapieerfolgs wird eine Kontrollanalyse ca. 8 Wochen nach Ende der Antibiotika-Einnahme empfohlen.



**Erläuterung der Keimkonzentrationen**

- = <10<sup>4</sup> (Sonderfall Aa: <10<sup>3</sup>)

(+) = 10<sup>4</sup> (Sonderfall Aa: 10<sup>3</sup>)

+ = <10<sup>5</sup> (Sonderfall Aa: <10<sup>4</sup>)

++ = <10<sup>6</sup> (Sonderfall Aa: <10<sup>5</sup>)

+++ = >10<sup>7</sup> (Sonderfall Aa: >10<sup>6</sup>)

**Abkürzungen der Bakteriennamen**

Aa = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Pg = *Porphyromonas gingivalis*

Tf = *Tannerella forsythia*

Td = *Treponema denticola*

Pi = *Prevotella intermedia*

Pm = *Peptostreptococcus micros*

Fn = *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*

Cr = *Campylobacter rectus*

En = *Eubacterium nodatum*


Ec = *Eikenella corrodens*


Cs = *Capnocytophaga spec. (gingivalis, ochracea, sputigena)*

<b>Raucherstatus</b>	Keine Angaben vorhanden. Sollte der Patient Raucher sein, ist dies in der Therapieplanung zu berücksichtigen und es wird eine genetische Risikobestimmung mit GenoType PSTplus empfohlen.
<b>Antibiotika-Überempfindlichkeit</b>	Keine Angaben über mögliche Antibiotika-Überempfindlichkeit. Die sichere Abklärung ist vor jeder Antibiotika-Therapie jedoch zwingend erforderlich!
<b>Ihre Bemerkungen</b>	Es wurden keine weiteren Bemerkungen angegeben.

Hain Lifescience GmbH | Hardwiesenstraße 1 | 72147 Nehren | Tel. [0 74 73] 94 51 -0 | Fax -31 | [www.hain-lifescience.de](http://www.hain-lifescience.de)

Abb. 2.6: Ergebnismitteilung micro-Ident® plus MT4





**Ergebnismitteilung micro-IDent® plus**  
**DNA-Nachweis von 11 parodontopathogenen Markerkeimen**

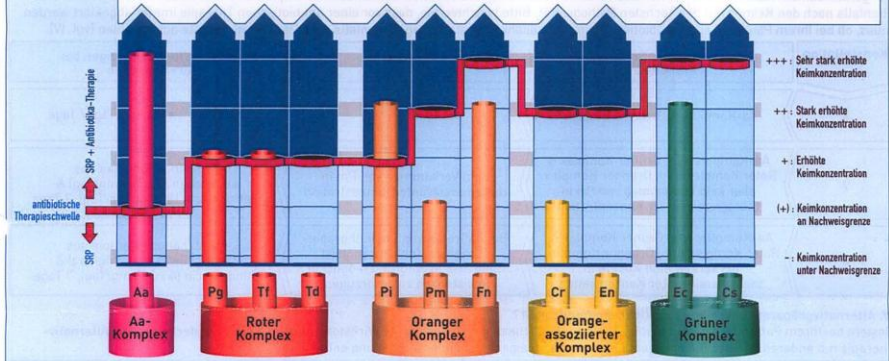
Hain Lifescience GmbH | Postfach 63 | D-72147 Nehren

**Dr. med. dent. M. Mayer M.S.D.**  
 Arndtstrasse 14  
 60325 Frankfurt

<b>Patient</b>	
<b>Geburtsdatum</b>	01.01.1974
<b>Probe</b>	2-Stellen-Probe / Probe 2 von 2
<b>Analyse</b>	Erstanalyse
<b>Analysen-Nr.</b>	ANA230436/50
<b>Analysendatum</b>	03.09.2007
<b>Zahn / Zähne</b>	BLAU/MT6-21/41
<b>Maximale Taschentiefe</b>	12mm

**Ergebnis**

Die mikrobiologische Analyse f... n ergab eine behandlungsbedürftige Bakterienbelastung mit Keimen der folgenden Komplexe: Aa-Komplex (Aa), Roter Komplex (Pg, Tf), Oranger Komplex (Pi). In Abhängigkeit vom klinischen Bild kann dies zusätzlich zur mechanischen Therapie (SRP) eine adjuvante Antibiotika-Behandlung (**Keimkonstellation 7**) erfordern. Zur Beurteilung des Therapieerfolgs wird eine Kontrollanalyse ca. 8 Wochen nach Ende der Antibiotika-Einnahme empfohlen.



**Erläuterung der Keimkonzentrationen**

- =  $<10^4$  (Sonderfall Aa:  $<10^3$ )

(+) =  $10^4$  (Sonderfall Aa:  $10^3$ )

+ =  $<10^5$  (Sonderfall Aa:  $<10^4$ )

++ =  $<10^6$  (Sonderfall Aa:  $<10^5$ )

+++ =  $>10^7$  (Sonderfall Aa:  $>10^6$ )

**Abkürzungen der Bakteriennamen**

Aa = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Pg = *Porphyromonas gingivalis*

Tf = *Tannerella forsythia*

Td = *Treponema denticola*

Pi = *Prevotella intermedia*

Pm = *Peptostreptococcus micros*

Fn = *Fusobacterium nucleatum/periodonticum*

Cr = *Campylobacter rectus*

En = *Eubacterium nodatum*

Ec = *Eikenella corrodens*

Cs = *Capnocytophaga spec.* (gingivalis, ochracea, sputigena)

Raucherstatus

Keine Angaben vorhanden. Sollte der Patient Raucher sein, ist dies in der Therapieplanung zu berücksichtigen und es wird eine genetische Risikobestimmung mit GenoType PSTplus empfohlen.

Antibiotika-Überempfindlichkeit

Keine Angaben über mögliche Antibiotika-Überempfindlichkeit. Die sichere Abklärung ist vor jeder Antibiotika-Therapie jedoch zwingend erforderlich!

Ihre Bemerkungen

Es wurden keine weiteren Bemerkungen angegeben.

Hain Lifescience GmbH | Hardwiesenstraße 1 | 72147 Nehren | Tel. (0 74 73) 94 51 -0 | Fax -31 | [www.hain-lifescience.de](http://www.hain-lifescience.de)

Abb. 2.7: Ergebnismitteilung micro-Ident® plus MT6

## **2.4 Statistische Analyse**

Für die an den mikrobiologischen Entnahmestellen erhobenen klinischen Parameter (ST, PAL-V) wurden für beide Entnahmestrategien Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen berechnet.

Zwei Zielgrößen wurden für jedes parodontalpathogene Bakterium analysiert.

- 1) Die semiquantitative Klassifikation (Klassen 0 bis 4)
- 2) Die Prävalenz, bzw. Nachweishäufigkeit der pathogenen Bakterien

Nachweisrate und Klassifikation (0-4) der Bakterienmenge der MT4- und der MT6-Ergebnisse werden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verglichen. Die Übereinstimmung beider Analysestrategien wurde durch die Kalkulation von „Cohen`s Kappa“ (Nachweisrate) und „weighted Kappa“ (semiquantitative Klassifikation) bestimmt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit einem Computerprogramm (Systat™ for Windows Version 10, Systat Inc. Evanston, USA). Die gewichteten Kappa-Koeffizienten wurden unter Zuhilfenahme einer Internetseite (<http://faculty.vassar.edu/lowry/kappa.html>) berechnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patienten

In dieser Studie wurden 50 Patienten (24 weiblich) im Alter von 30 bis 58 Jahren ( $47,4 \pm 10,6$ ) mit unbehandelter aggressiver (AgP: 08) oder generalisierter schwerer chronischer Parodontitis (ChP: 42) untersucht. Die Untersuchungen fanden in der Zeit von Oktober 2007 bis November 2008 in der Praxis von Dr. med. dent. Matthias Mayer MSc. statt. Die Tabelle 3.1 zeigt die Verteilung der Patienten nach Diagnose, Geschlecht und Alter.

Tabelle 3.1: Patienten entsprechend Diagnose, Geschlecht und Alter.

n	50
weiblich	24
AgP	8
Alter	$47,4 \pm 10,6$

#### 3.2 Klinische Parameter

Die mittlere Sondierungstiefe betrug an den MT4-Stellen  $7,09 \pm 1,41$  mm und an MT6-Stellen  $6,63 \pm 1,26$  mm (Tab. 3.2).

Der mittlere Attachmentlevel lag bei den MT4 Patienten bei  $7,51 \pm 1,55$  mm und bei MT6 Patienten  $7,05 \pm 1,46$  mm (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Klinische Parameter.

	MT4	MT6
ST/mm	$7,09 \pm 1,41$	$6,63 \pm 1,26$
PAL-V/mm	$7,51 \pm 1,55$	$7,05 \pm 1,46$

### 3.3 Analysestrategien: MT4 versus MT6 Analyse

#### 3.3.1 Nachweisrate

Die Nachweisrate lag bei den MT6 Patienten bei folgenden untersuchten Bakterien AA (MT4/MT6): 12%/16%, PG: 78%/80%, TF: 88%/94%, PI: 44%/46%, FN: beide bei 100%, CR: 80%/84%, und EC: 86%/88% höher als die Werte aus den Ergebnissen der MT4 analysierten Proben. Die Werte für die Spezies TD (92%/88%), PM (74%/70%), PN (64%/56%), und CS (64%/52%) lag bei MT4 höher als bei MT6. Keiner der Vergleiche ergab einen statistisch signifikanten Unterschied (Tab.3.3).

Tabelle 3.3:

Nachweisrate der untersuchten Bakterien [n=(%)] der gepoolten Analysen (MT4/MT6).

#### a) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT4	Negativ	42 (84%)	2 ( 4%)	44 (88%)
	Positiv	0 ( 0%)	6 (12%)	6 (12%)
Total		42 (84%)	8 (16%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,157$ )

Cohen's  $\kappa$ : 0,834; standard error: 0,113

#### b) *Porphyromonas gingivalis*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT4	Negativ	10 (20%)	1 ( 2%)	11 (22%)
	Positiv	0 ( 0%)	39 (78%)	39 (78%)
Total		10 (20%)	40 (80%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,317$ )

Cohen's  $\kappa$ : 0,940; standard error: 0,060

#### c) *Tannerella forsythia*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT4	Negativ	3 (6%)	3 ( 6%)	6 (12%)
	Positiv	0 (0%)	44 (88%)	44 (88%)
Total		3 (6%)	47 (94%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,083$ )

Cohen's  $\kappa$ : 0,638; standard error: 0,189



d) *Treponema denticola*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT4	Negativ	3 (6%)	1 (2%)	4 (8%)
	Positiv	3 (6%)	43 (86%)	46 (92%)
Total		6 (12%)	44 (88%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,317$ )

Cohen's  $\kappa$ : 0,558; standard error: 0,196

e) *Prevotella intermedia*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT <sup>3</sup>	Negativ	26 (52%)	2 (4%)	28 (56%)
	Positiv	1 (2%)	21 (42%)	22 (44%)
Total		27 (54%)	23 (46%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,564$ )

Cohen's  $\kappa$ : 0,879; standard error: 0,068

f) *Peptostreptococcus micros*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT4	Negativ	9 (18%)	4 (8%)	13 (26%)
	Positiv	6 (12%)	31 (62%)	37 (74%)
Total		15 (30%)	35 (70%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,527$ )

Cohen's  $\kappa$ : 0,505; standard error: 0,135

g) *Fusobacterium nucleatum*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT4	Negativ	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Positiv	0 (0%)	50 (100%)	50 (100%)
Total		0 (0%)	50 (100%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 1,00$ )

Cohen's  $\kappa$ : 1,000; standard error: 0,000

h) *Campylobacter rectus*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT4	Negativ	6 (12%)	4 (8%)	10 (20%)
	Positiv	2 (4%)	38 (76%)	40 (80%)
Total		8 (16%)	42 (84%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,414$ )

Cohen's  $\kappa$ : 0,595; standard error: 0,148

i) *Eubacterium nodatum*

		MT6		
		Negative	Positive	Total
MT4	Negativ	16 (32%)	2 (4%)	18 (36%)
	Positiv	6 (12%)	26 (52%)	32 (64%)
Total		22 (44%)	28 (56%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,157$ )  
Cohen's  $\kappa$ : 0,669; standard error: 0,106

j) *Eikenella corrodens*

		MT6		
		Negativ	Positive	Total
MT4	Negativ	4 (8%)	3 (6%)	7 (14%)
	Positiv	2 (4%)	41 (82%)	43 (86%)
Total		6 (12%)	44 (88%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,655$ )  
Cohen's  $\kappa$ : 0,558; standard error: 0,176

k) *Capnocytophaga species*

		MT6		
		Negativ	Positiv	Total
MT4	Negativ	14 (28%)	4 (8%)	18 (36%)
	Positiv	10 (20%)	22 (44%)	32 (64%)
Total		24 (48%)	26 (52%)	50

kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen MT4 und MT6 ( $p = 0,109$ )  
Cohen's  $\kappa$ : 0,434; standard error: 0,124

## 3.3.2 Semiquantitative Klassifikation

Median, Quartilabstand, Minimum/Maximum der semiquantitativen Bakterienmenge bei den gepoolten Untersuchungen von 4 (MT4) und 6 (MT6) Stellen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse sind der Tabelle 3.4 zu entnehmen.

### 3.4 Median, Quartilabstand, Minimum/Maximum der semiquantitativen Bakterienmenge bei den gepoolten Untersuchungen von 4 (MT4) und 6 (MT6) Stellen.

Tabelle 3.4:

	MT4	MT6	$P$	Weighted kappa
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>				
Median	0	0	0,357	0,775
Interquartilabstand	0-0	0-0		0,558-0,992
Minimum/Maximum	0-4	0-4		



<i>Porphyromonas gingivalis</i>				
Median	3	3	0,083	0,831
Interquartilabstand	2-3	2-3		0,717-0,944
Minimum/Maximum	0-4	0-4		
<i>Tannerella forsythia</i>				
Median	3	3	0,527	0,806
Interquartilabstand	2-3	2-3		0,673-0,939
Minimum/maximum	0-4	0-3		
<i>Treponema denticola</i>				
Median	2	2	0,439	0,645
Interquartilabstand	2-2	2-2		0,463-0,826
Minimum/Maximum	0-3	0-3		
<i>Prevotella intermedia</i>				
Median	0	0	0,716	0,806
Interquartilabstand	0-2	0-2		0,673-0,939
Minimum/Maximum	0-4	0-4		
<i>Peptostreptococcus micros</i>				
Median	2	1.5	0,062	0,570
Interquartilabstand	0-2	0-2		0,407-0,733
Minimum/Maximum	0-3	0-2		
<i>Fusobacterium nucleatum</i>				
Median	3	3	0,808	0,434
Interquartilabstand	3-3	3-3		0,191-0,676
Minimum/Maximum	1-4	2-4		
<i>Campylobacter rectus</i>				
Median	2	2	0,978	0,703
Interquartilabstand	1-3	1-3		0,574-0,832
Minimum/Maximum	0-4	0-3		
<i>Eubacterium nodatum</i>				
Median	1	1	0,197	0,563
Interquartilabstand	0-2	0-2		0,392-0,734
Minimum/Maximum	0-4	0-3		
<i>Eikenella corrodens</i>				
Median	2	3	0,305	0,749
Interquartilabstand	2-3	2-3		0,598-0,900
Minimum/Maximum	0-3	0-3		
<i>Capnocytophaga</i> Spezies				
Median	1	1	0,178	0,514
Interquartilabstand	0-2	0-2		0,335-0,692
Minimum/Maximum	0-4	0-4		

## 4 Diskussion

### 4.1 Fragestellung

Die Fragestellung in der vorliegenden Studie lautete, inwiefern die Ergebnisse gepoolter Proben von 4 verschiedenen Stellen (MT4) mit den Ergebnissen gepoolter Proben von 6 verschiedenen Stellen (MT6) für einen mikrobiologischen Gensondentest übereinstimmen und ob der Nachweis bzw. die Zahl der nachgewiesenen Bakterien zwischen diesen beiden Entnahmestrategien sich statistisch und klinisch signifikant unterscheiden.

Letztendlich war die primäre Frage, ob mit MT6 eine höhere Nachweishäufigkeit für parodontalpathogene Bakterien gelingt als mit MT4.

### 4.2 Methodik

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* treten häufig in Verbindung mit einer destruktiven Parodontalerkrankung auf (van Winkelhoff et al. 2002, Slots et al. 1986). Bragd et al. (1985) belegten, dass *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA) in der Ätiologie von aggressiven Parodontalerkrankungen eine besondere Bedeutung zukommt. AA ist ein mikroaerophiles, fakultativ anaerobes und gram-negatives kokkoides Stäbchen, das zur Familie der *Pasteurellaceae* gehört. Es können 6 verschiedene Serotypen identifiziert werden (Zambon et al. 1983), die sich in ihrer Virulenz unterscheiden (Fives-Taylor et al. 1999, Nørskov-Lauritsen & Kilian 2006). Zahlreiche Untersuchungen zeigten jedoch, dass eine mit AA assoziierte Parodontitis durch eine rein mechanische Entfernung des Biofilms von der Wurzeloberfläche nicht zuverlässig erfolgreich behandelt werden kann (Newman et al. 1976, Bragd et al. 1985, Christersson et al. 1992, Kornman & Robertson 1985, Müller et al. 1993). Je nachdem, welche Komplexe subgingivaler Mikroorganismen sich nachweisen lassen, werden unterschiedliche Antibiotikaregime vorgeschlagen (Beikler et al. 2004). In Kombination mit der mechanischen Parodontitistherapie kann der Einsatz von systemischen Antibiotika die Menge des vorhandenen AA unter die Nachweisgrenze supprimieren (van Winkelhoff et al. 1989, Dannewitz et al. 2007). Der Nachweis von AA ist also ein entscheidender Faktor, ob zusätzlich zur antiinfektiösen

mechanischen Therapie eine Antibiotikagabe indiziert ist. Für die Untersuchung bakterieller Plaque wurden viele verschiedene Analysetechniken entwickelt. Diese beinhalten die direkte Mikroskopie, bakteriologische Kulturen, immunologische Methoden (Antigen-Antikörper-Reaktionen), enzymatische Bakterientests, molekularbiologische Methoden, Nukleinsäure-Sonden (DNS- bzw. Oligonukleotid-Sonden) und Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Zur Auswertung von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA), *Tannerella forsythia* (TF), *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Prevotella intermedia* (PI), *Treponema denticola* (TD), *Peptostreptococcus micros* (PM), *Fusobakterium nucleatum* (FN), *Campylobacter rectus* (CR), *Eubacterium nodatum* (EN), *Eikenella corrodens* (EC) und *Capnocytophaga* Spezies (CS) verwendete man in der vorliegenden Studie einen kommerziellen PCR-DNS-Sondentest (micro-IDent<sup>®</sup>plus, Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren). Der micro-IDent<sup>®</sup>plus basiert auf der DNS-STRIP-Technologie. Die Nachweisgrenze dieses Tests liegt für Pm, Fn, Cr, En, Ec und *Capnocytophaga* Spezies bei  $10^4$  und für AA bei  $10^3$ .

Eick et al. (2002) verglichen zum Nachweis von parodontalpathogenen Bakterien in subgingivaler Plaque bakteriologische Kulturen mit einem kommerziellen PCR-DNS-Sondentest (micro-IDent<sup>®</sup>). Das Ergebnis dieses Vergleichs zeigte, dass die Analyse mit dem micro-IDent<sup>®</sup>Test häufiger den Nachweis für *P. gingivalis* und *T. forsythia* erbrachte als die bakteriologische Kultur. Schlussfolgernd empfahlen die Autoren, für die mikrobiologische Diagnostik einer progressiven Parodontitis die Methode der bakteriologischen Kultur, welche immer noch als Goldstandard gilt, durch die Methode der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction) zu ersetzen. AA ist nicht zwangsläufig an allen Stellen eines an Parodontitis erkrankten Patienten nachweisbar. Die Entnahme von subgingivalen Proben aller Zähne wäre die verlässlichste Variante, AA nachzuweisen. In einer anderen Studie berichteten Mombelli et al. (1994) über einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* vor Therapie und der Sondierungstiefe sowie dem Bluten auf Sondieren. Die höchste Wahrscheinlichkeit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nachzuweisen, besteht also in tiefen, blutenden Taschen. Da die mikrobiologische Untersuchung jedes Zahnes aus Kostengründen nicht praktiziert wird, ist die Entnahme der Plaqueproben aus den jeweils tiefsten parodontalen Taschen jedes Quadranten mit Blutung zum Nachweis

von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* geeignet, um ein repräsentatives Bild der subgingivalen Flora des jeweiligen Patienten zu bekommen. Mombelli et al. (1994) sammelten Proben von allen Zähnen, jedoch war hier die primäre Zielsetzung der Untersuchung, verschiedene Entnahmestrategien zu analysieren. In der täglichen Praxis werden aus ökonomischen Gründen die Proben aus den tiefsten Stellen jedes Quadranten entnommen und dann gepoolt analysiert. Für die untersuchten Mikroorganismen (AA, PG, TF, TD) lagen die Mittelwerte der logarithmierten Bakterienzahlen für die gepoolten Proben (MT3) statistisch signifikant höher als die Mittelwerte aus den Ergebnissen der separat analysierten Proben (Schacher et al. 2007). Diese Beobachtungen bestätigen auch die Ergebnisse weiterer Studien (Krigar et al. 2005, 2007) und können als Anreicherung der Bakterienzahl in der gepoolten Probe interpretiert werden. Vergleicht man die Studien von Schacher et al. (2007) und Krigar et al. (2007) bezüglich der Variabilität simultan entnommener Proben, konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: In der Studie von Schacher et al. wurden Proben von den jeweils 4 tiefsten Stellen entnommen (MT4) dagegen bei Krigar et al. nur von 3 Stellen (MT3). Die Variabilität der Nachweisrate der untersuchten Parodontalpathogene war bei der geringeren Anzahl von nur 3 Proben (MT3) höher als bei der Analyse von 4 Stellen (MT4). Es scheint, dass die Variabilität simultaner Proben um so größer ist, je weniger Proben man entnimmt. Die Untersuchung von 4 bzw. 6 Stellen ermöglicht wohl einen genaueren und reproduzierbareren Nachweis der vorhandenen Mikroorganismen.

Haffajee et al. (1992) untersuchten mit ihrer Analysestrategie die falsch negativen Ergebnisse der Nachweisrate ausgewählter Bakterienspezies. Sie verglichen die Plaqueproben von nur einer Stelle eines ausgewählten Zahnes mit Proben von: (a) dem oberen ersten Molar, (b) den oberen ersten Molaren, (c) den oberen und unteren ersten Molaren, (d) den sechs Ramfjord Zähnen, (e) der tiefsten Tasche und (f) den vier tiefsten Taschen. Die geringste Rate nichtnachgewiesener Bakterien wurde bei der Analysestrategie (f), den vier tiefsten Taschen gefunden. Beikler et al. (2006) analysierten vor und nach Parodontaltherapie verschiedene Untersuchungsstrategien zum Nachweis parodontalpathogener Keime. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die kombinierte Entnahme von supra- und subgingivaler Plaque aus den tiefsten Taschen eines jeden Sextanten, die verlässlichste Methode darstellt, die intraorale Bakterienbesiedlung eines Patienten darzustellen. Eine andere

Autorengruppe machte jedoch gegensätzliche Beobachtungen (Casas et al. 2007). Die Unterschiede lassen sich am besten aufgrund der verschiedenen Methoden erklären: Beikler et al. (2006) verwendeten Küretten, dagegen die Gruppe um Casas (2007) Papierspitzen. Beikler et al. (2006) verfolgten eine separate Analysestrategie, Casas et al. (2007) machten eine gepoolte Analyse. Es wurde bei der gepoolten Untersuchungsstrategie bislang nicht geklärt, ob die Entnahme von Plaqueproben aus den tiefsten Taschen jedes Sextanten (MT6), anstelle der tiefsten Taschen jedes Quadranten (MT4), die Wahrscheinlichkeit erhöht, parodontalpathogene Mikroorganismen nachzuweisen. In der vorliegenden Studie konnte das angewandte Testverfahren allerdings keinen Vorteil von (MT6) gegenüber (MT4) zeigen. Mittels Einzelstellen und gepoolter Analysestrategie, verglichen Schacher et al. (2007) subgingivale Plaqueproben von Patienten mit aggressiver und chronischer Parodontitis. Die Nachweismenge war in dieser Studie für alle getesteten Bakterien bei den gepoolten Proben höher als bei den Einzelstellenuntersuchungen. Die Nachweisrate einzelner Mikroorganismen war ebenfalls höher bei den gepoolten Proben. Jedoch waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant. Krugar et al. (2007) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie formulierten die Aussage, dass mit der gepoolten Analysestrategie, im Vergleich zur Einzelstellenanalyse, eine höhere Nachweisrate zu erzielen ist. Die Wahrscheinlichkeit existierende parodontalpathogene Bakterien nachzuweisen kann durch eine gepoolte Plaqueprobe demnach sogar erhöht werden. Des Weiteren konnte für TD ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich der zwei Analysestrategien festgestellt werden.

Eine weitere interessante Beobachtung im Verlauf der vorliegenden Studie war die geringe Verlässlichkeit der mikrobiologischen Untersuchungen. Für jede Analysestrategie wurden 2 sterile Papierspitzen jeweils in dieselbe parodontale Tasche eingeführt und anschließend wieder gemeinsam entfernt. Danach wurden die Papierspitzen aufgeteilt und anschließend einer separaten und einer gepoolten Analyse unterzogen. Das Ergebnis zeigte jedoch bei mehreren Patienten, dass die separate Analyse positiv für bestimmte Parodontalpathogene war, wohingegen die gepoolte nicht. Das gleiche Phänomen konnte auch umgekehrt beobachtet werden. Das Resultat zeigte eine geringe (AA: 0,299; TD: 0,389) bis moderate (TF: 0,468; PG: 0,450) Übereinstimmung beider Entnahmestrategien. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Cohen's kappa (Fleiss 1981). Ähnlich nachteilige

Ergebnisse wurden auch von Krigar et al. (2007) ermittelt, sie fanden heraus, dass verschiedene Papierspitzen die in ein und dieselbe Tasche appliziert wurden, nicht dieselben Mikroorganismen nachweisen konnten. Am besten lässt sich diese Beobachtung wohl aufgrund der ungleichmäßigen Verteilung und der verschiedenen Konzentrationen der sich in den Taschen befindlichen Bakterien erklären. Mehrere gepoolte Analysen der Proben bei einem Patienten könnten eine wirkungsvolle Strategie für dieses Problem sein. Jedoch besteht auch bei den gepoolten Analysen das Risiko eines falsch negativen Ergebnisses: Die eine Probe erbringt den Nachweis der parodontalpathogenen Bakterien, die andere aber nicht. In dieser Studie wurden sterile Papierspitzen für die Probeentnahme verwendet, was als Standard bei den zumindest in Deutschland kommerziell erhältlichen Gensondentests gilt. Des Weiteren wurden mit dieser Technik auch schon viele mikrobiologische Studien durchgeführt (Bragd 1985, Krigar et al. 2007, Schacher et al. 2007, Baron et al. 2008). Allerdings haben Papierspitzen einen materialspezifischen Nachteil bei der Probeentnahme aus dem Sulkus. Wenn sie bedingt durch die Sulkusflüssigkeit nass werden, verlieren sie ihre Stabilität und es wird schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, sie bis zum Boden der parodontalen Tasche einzuführen. Ein weiterer Nachteil, welcher in dieser Studie beobachtet werden konnte, war die Tatsache, dass verschiedene Papierspitzen, die in dieselbe Tasche inseriert wurden, nicht die gleichen Mikroorganismen angenommen haben. Eine Erklärung dafür könnte die Beschränkung der Entnahme auf die schwimmende, lose Plaque sein, mit der Konsequenz, dass die Keime der fester haftenden Plaque nicht berücksichtigt werden (Hartroth et al. 1999). Subgingivale Plaque kann auch mit Küretten entnommen werden (Beikler et al. 2006, Mombelli et al. 1994). Küretten bestehen aus Stahl und sind somit auch im feuchten Milieu formstabil. Des Weiteren ermöglicht die Kürette im Vergleich zur Papierspitze, subgingivale Plaque von einem größeren Areal zu sammeln. Das Sammeln von Plaque mit einer Kürette könnte somit den Nachteil von Papierspitzen eliminieren. Jedoch gewinnt man mit standardisierten Papierspitzen standardisierte Plaqueproben, was von den untersuchenden Laboren bevorzugt wird. Jervøe-Storm et al. (2007) untersuchten mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion unterschiedliche Entnahmemethoden (Papierspitzen/Küretten). Das Resultat zeigte, dass die Zusammensetzung der Plaqueproben in Bezug auf die zu analysierenden Parodontalpathogene bei beiden Analysestrategien gleich waren und somit auch beide Techniken für die

mikrobiologische Diagnostik geeignet sind. Sixou et al. (1991) verglichen vier verschiedene Entnahmetechniken und kamen dabei zu dem Ergebnis, dass die Gewinnung von Plaqueproben mit einer Kürette sowohl quantitativ als auch qualitativ als absolut effizient zu betrachten ist. Jedoch mußten sie feststellen, dass es problematisch war, die Untersuchungen zu standardisieren und reproduzierbare Werte zu ermitteln. Die Entnahmetechnik mit Papierspitzen wurde aufgrund der hohen Verlässlichkeit innerhalb der Studie und der guten Reproduzierbarkeit der Werte von den Autoren favorisiert. Renvert et al. (1992) empfanden die Analysestrategie mit Papierspitzen als die beste Alternative, da sie mit dieser Methode eine deutlich höhere Nachweisrate für Bakterienkolonien und Spirochäten erzielen konnten. Weitere Studien werden notwendig sein, um den vor- bzw. nachteiligen Effekt der verschiedenen Entnahmemethoden (Papierspitze/Kürette) bei der mikrobiologischen Analyse genauer darzustellen.

Im Falle einer aggressiven oder generalisiert schweren chronischen Parodontitis wird die zusätzliche Anwendung von Antibiotika bei der mechanischen Therapie häufig davon abhängig gemacht, ob AA nachgewiesen werden konnte (Eickholz et al. 2005). Mehrere Studien zeigten, dass es nicht möglich war, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* nur durch nichtchirurgische und chirurgische Therapie allein unter die Nachweisgrenze zu supprimieren oder sogar zu eliminieren. (Christersson et al. 1985, Schacher et al. 2007, Mombelli et al. 1994, Müller et al. 1993, Takamatsu et al. 1999). Die Eliminierung bzw. das Unterschreiten der Nachweisgrenze von AA ist jedoch eine wichtige Voraussetzung zum Erreichen guter klinischer Resultate (Schacher et al. 2007). Mombelli et al. (2002) untersuchten in einem systematischen Review, inwieweit das Vorhandensein oder das Fehlen parodontalpathogener Keime die Unterscheidung zwischen Patienten mit chronischer und aggressiver Parodontitis ermöglicht. Sie kamen unter anderem zu der Schlussfolgerung, dass sich zwar *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* häufiger bei aggressiver Parodontitis als bei chronischer nachweisen ließ, aber als diagnostischer Test hatte dieser Nachweis eine geringe Sensitivität und Spezifität. Dies wurde ebenso von Schacher et al. (2007) festgestellt. In einer weiteren Studie hatte der Nachweis von AA als diagnostischer Test für AgP eine Sensitivität von 43-60% und einen positiven Vorhersagewert von 54-69%. Die Spezifität und der negative Vorhersagewert lagen zwischen 63-73% bzw. 53-65% (Krigar et al. 2007). Das Vorkommen von AA scheint die klinische Diagnose AgP zu bestätigen und beeinflusst die Wahl der Therapie,

aber um als diagnostischer Test genutzt zu werden, war die Sensitivität zu gering. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ist ein Keim, der über ein kleines Arsenal von Virulenzfaktoren verfügt, die aber bei verschiedenen Genotypen unterschiedlich ausgeprägt sind. Genotyp b, der sogenannte hochtoxische Klon, verfügt über ein besonders potentes Leukotoxin und wird vor allem bei aggressiver Parodontitis gefunden, während Genotyp a häufiger bei chronischer Parodontitis zu finden ist. Genotyp c schließlich wird überwiegend bei parodontal Gesunden gefunden und scheint demnach über ein geringes Pathogenitätspotential zu verfügen (Haffajee & Socransky 1994, Eickholz 2006). Mombelli et al. (2002) kamen zu dem Ergebnis, dass der hochtoxische Klon von AA nur bei Patienten mit AgP vorkam, wobei in einer anderen Studie von (Cortelli et al. 2005) dieser Subtyp auch bei 19% der Patienten mit ChP festgestellt werden konnte. In der vorliegenden Studie wurde AA häufiger bei Patienten mit aggressiver Parodontitis gefunden als bei Patienten, bei denen eine generalisiert schwere Parodontitis diagnostiziert wurde. Man muss jedoch berücksichtigen, dass der Unterschied der Nachweisrate zwischen aggressiver und chronischer Parodontitis primär von der Entnahmestrategie abhängig ist. Ein anderer Autor hat allerdings schon in früheren Studien gezeigt, dass der Nachweis von AA nur eine limitierte, diagnostische Aussagekraft in Bezug auf die aggressive Parodontitis hat (Tonetti et al. 1999).

Folgende Aussagen lassen sich nach der Diskussion aller in dieser Arbeit verwendeten Studien formulieren: Die Entnahme subgingivaler Plaqueproben von allen Zähnen ist zu zeitaufwendig und zu kostenintensiv, um sie im täglichen Praxiseinsatz zu realisieren. Plaqueproben der tiefsten Tasche aus jedem Quadranten (MT4) bzw. jedem Sextanten (MT6) kann als die verlässlichste Methode zum Nachweis subgingivaler, parodontalpathogener Bakterien bei unbehandelten Patienten angesehen werden. Aus ökonomischen Gründen sollten die entnommenen Proben im Praxisalltag gepoolt analysiert werden. Mit der gepoolten Analysestrategie ist im Vergleich zur Einzelstellenanalyse eine höhere Nachweisrate zu erzielen. Die Wahrscheinlichkeit, existierende parodontalpathogene Bakterien nachzuweisen, kann durch eine gepoolte Plaqueprobe demnach sogar erhöht werden. Bislang wurde keine Studie durchgeführt, die untersuchte, inwiefern die Ergebnisse gepoolter Proben von 4 verschiedenen Stellen (MT4) mit den Ergebnissen gepoolter Proben von 6 verschiedenen Stellen (MT6) für einen mikrobiologischen Gensondentest übereinstimmen und ob der Nachweis bzw. die Zahl der nachgewiesenen Bakterien



statistisch und klinisch eine Signifikanz besitzt. Diese Lücke soll mit der hier vorliegenden Studie überbrückt werden.

Bezogen auf Alter, Geschlecht sowie den klinischen Parametern (ST, PAL-V) ist die untersuchte Patientenpopulation vergleichbar mit den analysierten Populationen vorausgegangener Studien (Schacher et al. 2007, Krigar et al. 2007). Jedoch waren im Kontrast zu den oben angesprochenen Studien in der vorliegenden Untersuchung nur 8 Patienten (16%) mit aggressiver Parodontitis eingebunden. Andere Studien konnten allerdings belegen, dass ein höheres Vorkommen von AA bei Patienten mit aggressiver Parodontitis vorlag, als bei Patienten mit chronischer Parodontitis (Schacher et al. 2007, Krigar et al. 2007, Mombelli et al. 2002).

Für alle untersuchten Mikroorganismen (AA, PG, TF, TD, PI, PM, FN, CR, EN, EC und CS) ergab der Zentralwert, Quartilabstand, Minimum/Maximum der semiquantitativen Bakterienmenge bei den gepoolten Untersuchungen von 4 (MT4) und 6 (MT6) Stellen keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Die Nachweisrate lag bei den MT6 Patienten bei folgenden untersuchten Bakterien: AA (MT4/MT6): 12%/16%, PG: 78%/80%, TF: 88%/94%, PI: 44%/46%, FN: beide 100%, CR: 80%/84%, und EC: 86%/88% höher als die Werte aus den Ergebnissen der MT4 analysierten Proben. Die Werte für die Spezies: TD (92%/88%), PM (74%/70%), PN (64%/56%) und CS (64%/52%) lag bei MT4 höher als bei MT6. Keiner der Vergleiche ergab einen statistisch signifikanten Unterschied.

PG, TF, TD, PI, FN, CR und EC konnten bei allen Patienten nachgewiesen werden (PG: 80%, TF: 94%, TD: 94%, PM: 82%, FN: 100%, CR: 88%, EC: 92%). PI kam in 48%, EN in 68% und CS in 72% aller Fälle vor. Die Nachweisrate steht im Einklang mit den Ergebnissen vorausgegangener Studien (Schacher et al 2007, Krigar et al. 2007). Baron et al. (2008) zeigte ein Vorkommen von 95% für FN und 75% für PI. AA kam nur in 16% der Fälle vor, wohingegen andere Studien eine höhere Nachweisrate für AA hatten. In der Studie von Schacher et al. (2007) waren bei einer Patientenpopulation von 54% mit unbehandelter aggressiver Parodontitis 38% der Probanden AA positiv mit und in einer weiteren Untersuchung von Krigar et al. (2007) lag die Nachweisrate für AA bei 26% der 27% umfassenden Patientenpopulation mit unbehandelter aggressiver Parodontitis. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass AA eine wichtige Rolle in der Ätiologie der aggressiven Parodontitis übernimmt und das AA auch häufiger bei diesen Patienten nachgewiesen werden kann (Bragd et al. 1985, Schacher et al. 2007, Mombelli et al. 2002). Die geringe Nachweisrate von AA

in der vorliegenden Studie kann am besten damit erklärt werden, dass nur 8 Patienten mit aggressiver Parodontitis rekrutiert werden konnten. Für alle untersuchten Mikroorganismen (AA, PG, TF, TD, PI, PM, FN, CR, EN, EC und CS), ergab die Analyse bei den gepoolten Untersuchungen von 4 (MT4) und 6 (MT6) Stellen keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Nachweisrate.

Die Übereinstimmung beider Analysestrategien wurde durch die Kalkulation von „Cohen`s Kappa“ (Nachweisrate) (Fleiss 1981) und „weighted Kappa“ (semiquantitative Klassifikation) bestimmt. Die Übereinstimmung war moderat für (CS: 0,434, TD 0,558, PM: 0,505, CR: 0,595, EC: 0,558) und hoch für (TF: 0,638, EN: 0,669, AA: 0,834, PG: 0,940, PI: 0,879).

Das Ergebnis zeigte jedoch bei einigen Patienten, dass die MT4 Analyse positiv für bestimmte Parodontalpathogene war, die Analyse mit MT6 aber nicht. Das gleiche Phänomen konnte auch umgekehrt beobachtet werden.

Diese Beobachtung könnte auf die ungleichmäßige Verteilung oder auch auf die unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen Mikroorganismen in den parodontalen Taschen zurückzuführen sein. Eine Analysestrategie erbringt den Nachweis, wohingegen die andere nicht. Abschließend kann man vermuten, dass dies wohl dem Zufallsprinzip unterliegt. Eine Bakterienspezies kann aus dem Eluat im Labor pipettiert werden, die andere jedoch nicht.

#### 4.3 Schlussfolgerung

Unter Berücksichtigung der Limitationen der vorliegenden Studie kann man folgende Schlussfolgerung formulieren: Die Nachweisrate von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) und *Tannerella forsythia* (Tf) war statistisch insignifikant höher bei der Probenentnahme aus der jeweils tiefsten Tasche jedes Sextanten (MT6) eines Patienten mit unbehandelter Parodontitis als die Entnahme von nur vier Stellen (MT4). Jedoch ergaben die Werte keine statistisch signifikanten Unterschiede. Das bedeutet, die gepollte Analyse subgingivaler Plaque, ist für das untersuchte mikrobiologische Analyseverfahren mit 4 Entnahmestellen genauso verlässlich wie mit 6 Entnahmestellen um Parodontalpathogene bei einem Patienten nachzuweisen. PG, TF, TD, PI, FN, CR, und EC sind in 80 bis 100% aller Patienten mit unbehandelter aggressiver und generalisiert schwerer chronischer Parodontitis nachweisbar.

## **5 Zusammenfassung**

Von den etwa 700 verschiedenen Bakterienarten, die die Mundhöhle besiedeln, können etwa 300 Arten subgingival gefunden werden (Paster et al. 2001, 2006), und von diesen sind einige besonders häufig mit parodontaler Destruktion assoziiert (Socransky et al. 1998]. Die wichtigsten Keime sind: *Aggregatibacter* (früher: *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* (Nørskov-Lauritsen & Kilian 2006), *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Treponema denticola* (Socransky et al. 1998). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass *A. actinomycetemcomitans* (AA) in der Ätiologie von aggressiven Parodontalerkrankungen eine besondere Bedeutung zukommt (Bragd et al. 1985). Zahlreiche Untersuchungen konnten zeigen, dass eine mit AA assoziierte Parodontitis durch eine rein mechanische Entfernung des Biofilms von der Wurzeloberfläche nicht zuverlässig erfolgreich behandelt werden kann (Christersson et al. 1985, Kornman & Robertson 1985, Mombelli et al. 1994). Für die Entscheidung, ob zusätzlich zur mechanischen antiinfektiösen Therapie systemisch Antibiotika gegeben werden sollen, hat der Nachweis von AA also Bedeutung. Je nachdem, welche Komplexe subgingivaler Mikroorganismen sich nachweisen lassen, werden unterschiedliche Antibiotikaregime vorgeschlagen (Beikler et al. 2004).

### **Ziele dieser Studie**

Vergleich von Nachweishäufigkeit und Keimzahl nach Auswertung von gepoolten subgingivalen Plaqueproben mittels semiquantitativer PCR aus den tiefsten Taschen jedes Quadranten bzw. Sextanten.

### **Methode**

Es wurden 50 Patienten, die sich zur systematischen Parodontitistherapie in der Praxis von Dr. Matthias Mayer, MSD, Arndtstr. 14, 60325 Frankfurt, vorstellten und bei denen eine aggressive oder generalisierte schwere chronische Parodontitis diagnostiziert wurde, für diese Studie rekrutiert.

Für die Probenentnahme wurden jeweils die parodontalen Taschen mit der höchsten Sondierungstiefe eines jeden Quadranten ausgewählt. Existierten mehrere solche Stellen mit gleichem Attachmentverlust, wurde die Stelle gewählt, die Zeichen einer aktiven Entzündung, wie Bluten auf Sondieren oder Suppuration aufwies.

Nach relativer Trockenlegung mittels Watterollen wurden jeweils 2 sterile Papierspitzen gleichzeitig an den ausgewählten Stellen nach subgingival platziert und für 20 Sekunden belassen. Anschließend wurde jeweils eine Papierspitze von jeder Stelle in eines von 2 Transportgefäßen gegeben, so dass für denselben Patienten 2 gepoolte Proben von denselben Stellen entstanden (MT4). Anschließend wurden von den tiefsten Stellen jedes der bisher nicht berücksichtigten Sextanten mittels jeweils einer Papierspitze in der oben beschriebenen Weise Plaqueproben entnommen. Diese beiden Papierspitzen wurden in eines der beiden Transportgefäße gegeben (MT4→MT6). Zur Analyse für das Vorliegen von *A. actinomycetemcomitans* (AA), *T. forsythia* (TF), *P. gingivalis* (PG), *P. intermedia* (PI), *T. denticola* (TD), *P. micros* (PM), *F. nucleatum* (FN), *C. rectus* (CR), *E. nodatum* (PN), *E. corrodens* (EC), und *Capnocytophaga* species (CS) wurden die Proben mit einem kommerziellen PCR-DNS-Sondentest ausgewertet. (micro-IDent<sup>®</sup> plus, Hain Lifescience GmbH, Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Deutschland). Nachweisrate und Klassifikation (0-4) der Bakterienmenge der MT4- und der MT6-Ergebnisse werden mittels Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben verglichen.

## **Ergebnisse**

Die Nachweisrate lag bei den MT6 Patienten bei folgenden untersuchten Bakterien: AA (MT4/MT6): 12%/16%, PG: 78%/80%, TF: 88%/94%, PI: 44%/46%, FN: beide 100%, CR: 80%/84%, und EC: 86%/88% höher als die Werte aus den Ergebnissen der MT4 analysierten Proben. Die Werte für die Spezies: TD (92%/88%), PM (74%/70%), PN (64%/56%), und CS (64%/52%) waren bei den MT4 Patienten höher. Keiner der vergleichenden Werte ergab einen statistisch signifikanten Unterschied.

## **Schlussfolgerung**

Die Nachweisrate von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) und *Tannerella forsythia* (Tf) war statistisch insignifikant höher bei der Probenentnahme aus der tiefsten Tasche jedes Sextanten

(MT6) eines Patienten mit unbehandelter Parodontitis als die Entnahme von nur vier Stellen (MT4). Jedoch ergaben die Werte keinen statistisch signifikanten Unterschied. Das bedeutet, die gepoolte Analyse subgingivaler Plaque ist mit 4 Entnahmestellen genauso verlässlich wie mit 6 Entnahmestellen um Parodontalpathogene bei einem Patienten nachzuweisen. PG, TF, TD, PI, FN, CR, und EC sind in 80 bis 100% aller Patienten mit unbehandelter aggressiver und generalisiert schwerer chronischer Parodontitis nachweisbar.

### **Hinweis**

Diese Studie wurde von der Firma Hain Lifescience GmbH, Nehren, Deutschland unterstützt.

## 5.1 Summary

From the approximately 700 bacterial species colonizing periodontal pockets and further 300 the rest of the oral cavity, approximately one half are closely associated with periodontal destruction. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythensis* (Tf), and *Treponema denticola* (Td) are considered periodontal pathogens. Aa has an important role in the etiology of aggressive periodontal disease. Periodontal disease associated with Aa in many cases cannot be treated reliably and predictively by mechanical removal of the subgingival biofilm alone. Thus, the detection of Aa may be an indicator for the presence of AgP and is a significant factor contributing to the decision whether mechanical antiinfective therapy should be used in conjunction with systemic antibiotics.

For microbiological testing prior to antiinfective therapy, subgingival plaque samples should be taken from the deepest pockets exhibiting signs of activity, i.e. bleeding or suppuration. A microbiological analysis representative for the subgingival microflora of the whole oral cavity is relevant for adjunctive systemic antibiotic therapy of certain forms of periodontitis.

**Objective:** Comparison of detection frequency of periodontal pathogens in patients with aggressive or severe chronic periodontitis using pooled plaque samples from the deepest pockets per quadrant and per sextant.

**Methods:** In 50 patients with aggressive (n=8) or chronic periodontitis (n=42), subgingival plaque was sampled from the deepest pockets per quadrant (MT4) and per sextant (MT6). Plaque samples were taken using two sterile paper points simultaneously. One paper point from each pocket was pooled with the three other paper points of the pockets (MT4). Subsequently, the remaining 4 paper points were pooled with two paper points from the deepest pockets from the two remaining sextants (MT6). The content of each vial was analysed with PCR (Hain microlDent®plus, Hain Lifescience, Nehren, Germany) for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA), *Tannerella forsythia* (TF), *Porphyromonas gingivalis* (PG), *Treponema denticola* (TD), *Prevotella intermedia* (PI), *Peptostreptococcus micros* (PM), *Fusobacterium nucleatum* (FN), *Campylobacter rectus* (CR),

*Eubacterium nodatum* (PN), *Eikenella corrodens* (EC), and *Capnocytophaga* species (CS). Detection frequency was compared using the Wilcoxon-Test.

**Results:** The detection frequency of AA (MT4/MT6): 12%/16%, PG: 78%/80%, TF: 88%/94%, PI: 44%/46%, FN: both 100%, CR: 80%/84%, and EC: 86%/88% was higher with MT6 than with MT4. For TD (92%/88%), PM (74%/70%), PN (64%/56%), and CS (64%/52%) the detection frequency was higher with MT4. None of these differences was statistically significant.

**Conclusion:** Within the limitations of the present study the following conclusion may be drawn: (a) regarding semi quantitative bacterial counts and detection frequency of the tested microorganisms sampling the deepest sites per sextant (MT6) has no advantage over sampling the deepest sites per quadrant (MT4). Thus, pooled analysis of subgingival plaque samples from 4 sites is as good as from 6 sites to describe subgingival periodontal pathogens on the patient level (b) PG, TF, TD, PI, FN, CR, and EC may be detected in 80 to 100% of all patients with untreated aggressive and generalized severe chronic periodontitis.

### **Acknowledgments**

This study was supported by Hain Lifescience, Nehren, Germany.

## 6 Literaturverzeichnis

Al-Yahfoufi Z, Mombelli A, Wicki A, Lang NP: The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Arabic population with minimal periodontal disease. Microb Ecol Health Dis 7, 217-224, 1994.

American Academy of Periodontology (AAP). Consensus Report: Periodontal diagnosis and diagnostic aids. In Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics. ed. The American Academy of Periodontology, pp. I/23- I/33, 1989.

Armitage GC: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 4,1-6, 1999.

Baehni P, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF, Taichman NS: Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. Infect Immun 24, 233-243, 1979.

Bagg J, MacFarlane TW, Poxton IR, Miller CH, Smith AJ: Essentials of microbiology for dental students. Oxford University Press, Oxford 1999.

Baker PJ, Butler R, Wikesjö UM: Bacterial sampling by absorbent paper points. An in vitro study. J Periodontol 62, 142-146, 1991.

Baron F, Arndt R, Roßberg M, Schacher B, Wohlfeil M, Eickholz P: Prävalenz von *Fusobacterium nucleatum* und *Prevotella intermedia* in subgingivaler Plaque bei zwei Analysestrategien. Parodontologie 19, 233-240, 2008.

Beikler T, Karch H, Flemmig TF: Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK). Dtsch Zahnärztl Z 60, 660-662, 2005.

Beikler T, Prior K, Ehmke B, Flemmig TF: Specific antibiotics in the treatment of periodontitis - A proposed strategy. J Periodontol 75, 169-175, 2004.

Beikler T, Schnitzer S, Abdeen G, Ehmke B, Eisenacher M, Flemmig TF: Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. J Periodontol 77, 1323-1332, 2006.

Bragd L, Dahlen G, Wikström M, Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; retrospective study. J Clin Periodontol 14, 95-99, 1985

Bragd J, Wikström M, Dahlen G, Slots J: The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis: a retrospective study. J Clin Periodontol 14, 94-99, 1987.

Brecx MC, Gautschi M, Gehr P, Lang NP: Variability of histologic criteria in clinically healthy human gingiva. J Periodontal Res 22, 468-472, 1987.



Carranza FA Jr: Bone loss and patterns of bone destruction. In: Carranza FA Jr, Newman MG (eds.): Clinical periodontology 8th ed., pp. 297-313, W.B. Saunders, Philadelphia 1996.

Casas A, Herrera D, Martin-Carnes J, Gonzáles I, O'Connor A, Sanz M: Influence of sampling strategy on microbiologic results before and after periodontal therapy. J Periodontol 78, 1103-1112, 2007.

Christersson LA, Fransson CL, Dunford RG, Zambon JJ: Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis. J Periodontol 63, 418-425, 1992.

Christersson LA, Slots J, Rosling BG, Genco RJ: Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. J Clin Periodontol 12, 465-476, 1985.

Cortelli JR, Cortelli SC, Jordan S, Haraszthy VI, Zambon JJ: Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. J Clin Periodontol 32, 860-866, 2005.

Dannewitz B, Pohl S, Eickholz P, Kim TS.: Clinical and microbiological effects of a combined mechanic-antibiotic therapy in subjects with Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. Am J Dent 20, 153-6, 2007.

Darveau RP, Tanner A, Page RC: The microbial challenge in periodontitis. Periodontol 2000 14, 12-32, 1997.

Dawson MT, Powell R, Gannon F: Gene technology. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1996.

Deutsche Gesellschaft für Parodontologie (Hrsg.): Klassifikation der Parodontalerkrankungen. Quintessenz, Berlin, 2002.

Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD: The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. J Clin Periodontol 15, 316-323, 1988.

Ehmke B, Moter A, Beikler T, Milian E, Flemmig TF: Adjunctive antimicrobial therapy of periodontitis: long-term effects on disease progression and oral colonization. J Periodontol 76, 749-759, 2005.

Eick S, Pfister W.: Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 29, 638-44, 2002.

Eickholz P: Ätiologie. In: Heidemann D (Hrsg.): Praxis der Zahnheilkunde: Parodontologie. 4. Auflage, Urban & Fischer/Elsevier Verlag, München, 33-70, 2005.

Eickholz P: Was tun bei aggressiver Parodontitis? Parodontologie 17, 357-369, 2006.

Ezzo PJ, Cutler CW: Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol* 2000 32, 24-35, 2003.

Fives-Taylor, P., Meyer, D., Mintz, K., Brissette, C.: Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol* 2000 10, 136-167, 1999.

Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 2nd edition, John Wiley & Sons, New York 223-225, 1981.

Fleiss JL, Wallenstein S, Chilton NW, Goodson JM.: A re-examination of within-mouth correlations of attachment level and of change in attachment level. *J Clin Periodontol* 15, 411-414, 1988.

Flemmig TF: Periodontitis. *Ann Periodontol* 4, 32-38, 1999.

Flemmig TF, Christgau M, Karch H: Mikrobiologische Diagnostik bei marginalen Parodontopathien. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK). *Dtsch Zahnärztl Z* 53, 825-826, 1998.

Fransson C, Berglundh T, Lindhe J: The effect of age on the development of gingivitis. Clinical, microbial and histological findings. *J Clin Periodontol* 23, 379-385, 1996.

Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras A, Gamonal J: Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 76, 289-294, 2005.

Garcia L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J, Sanz M: Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodontal Res* 33, 59-64, 1998.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ: Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol* 2000 14, 112-143, 1997.

Gibbs RA: DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal Chem* 62, 1202-1214, 1990.

Gmür R, Guggenheim B: Periodontal microbial diagnosis. The methods and limits of periodontal microbial diagnosis. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 104, 1096-1108, 1994.

Greenstein G: Microbiologic assessments to enhance periodontal diagnosis. *J Periodontol* 59, 508-515, 1988.

Guerrero A, Griffiths GS, Nibali L, Suvan J, Moles DR, Laurell L, Tonetti MS: Adjunctive benefits of systemic amoxicillin and metronidazole in non-surgical treatment of generalized aggressive periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial: *J Clin Periodontol* 32, 1096-1107, 2005.

Haffajee AD, Socransky SS: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5, 78-111, 1994.

Haffajee AD, Socransky SS, Ebersole JL, Smith DJ: Clinical, microbiological and immunological features associated with the treatment of active periodontosis lesions. *J Clin Periodontol* 11, 600-618, 1984.

Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM: Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol* 10, 298-310, 1983.

Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E, Zambon JJ: Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. *J Periodontol* 71, 912-922, 2000.

Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G: Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol* 14, 326-330, 1999.

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH, Vogt PH: Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23, 504-511, 1997.

Holt SC, Bramanti TE: Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2, 177-281, 1991.

Jervøe-Storm PM, Alahdab H, Koltzsch M, Fimmers R, Jepsen S.: Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 78, 909-917, 2007.

Kelstrup J, Theilade E: Microbes and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1, 15-35, 1974.

Kim CK, Choi SH, Kim TS, Kaltschmitt J, Eickholz P: The infrabony defect and its determinants. *J Periodont Res* 41, 498-502, 2006.

Kinane DF: Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 25, 8-20, 2001.

Kinane DF, Lindhe J: Pathogenesis of periodontitis. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP (eds.): *Clinical periodontology and implant dentistry*. 3rd ed, pp. 189-225, Munksgaard, Copenhagen 1997.

Klinger R: Untersuchungen über menschliche Aktinomykose. *Zentralbl Bakteriologie* 62, 191-200, 1912.

Konishi N, Torii Y, Kurosaki A, Takatsuka T, Itota T, Yoshiyama M.: Confocal laser scanning microscopic analysis of early plaque formed on resin composite and human enamel. *J Oral Rehabil* 30, 790-795, 2003.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS: The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 14, 33-53, 1997.

- Kornman, K., Robertson, P.: Clinical and microbiological evaluation of therapy of juvenile periodontitis. J Periodontol 56, 443-446, 1985.
- Krigar D, Kaltschmitt J, Krieger JK, Eickholz P: Two subgingival plaque sampling strategies used with RNA-probes. J Periodontol 78, 72-78, 2007.
- Krigar D, Kaltschmitt J, Radek M, Eickholz P: Vergleich zweier Entnahmestrategien subgingivaler Plaqueproben für mikrobiologische Gensonden-Tests. Dtsch Zahnärztl Z 60, 219-224, 2005.
- Lai CH, Listgarten MA, Shirakawa M, Slots J: *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol Immunol 2, 152-157, 1987.
- Lakio L, Paju S, Alfthan G, Tirola T, Asikainen S, Pussinen PJ: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype d-specific antigen contains the O antigen of lipopolysaccharide. Infect Immun 71, 5005-5011, 2003.
- Lamster IB, Celenti RS, Jans HH, Fine JB, Grbic JT: Current status of tests for periodontal disease. Adv Dent Res 7, 182-190, 1993.
- Listgarten MA: The structure of dental plaque. Periodontol 2000 5, 52-65, 1994.
- Listgarten MA, Hellden L: Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. J Clin Periodontol 5, 115-132, 1978.
- Listgarten MA, Lai CH, Young V: Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. J Periodontol 64, 155-161, 1993.
- Löe H, Theilade E, Jensen SB: Experimental gingivitis in man. J Periodontol 36, 177-187, 1965.
- Loesche WJ: DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. J Periodontol 63, 1102-1109, 1992.
- Loesche WJ: The antimicrobial treatment of periodontal disease: changing the treatment paradigm. Crit Rev Oral Bio Med 10, 245-275, 1999.
- Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P: Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. J Clin Microbiol 30, 427-433, 1992.
- Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE, Stoll J: The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol 53, 223-230, 1982.
- Marsh PD, Bradshaw DJ : Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res 71, 1431-1438, 1995.

Mombelli AW: The role of dental plaque in the initiation and progression of periodontal diseases. In: Lang NP, Atström R, Loe H (eds). Proceedings of the European Workshop on Mechanical Plaque Control. Quintessence, 85-97, 1998.

Mombelli AW, Casagni F, Madianos PN: Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. J Clin Periodontol 29 (Suppl. 3), 10-21, 2002.

Mombelli A, Gmür R, Gobbi C, Lang NP: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. I. Topographic distribution before and after treatment. J Periodontol 65, 820-826, 1994.

Mombelli A, McNabb H, Lang NP: Black-pigmenting Gram-negative bacteria in periodontal disease. I. Topographic distribution in the human dentition. J Periodont Res 26, 301-307, 1991.

Moore WCE, Moore LVH: The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 5, 66-77, 1994.

Moughal NA, Adonogianaki E, Thornhill MH, Kinane DF: Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. J Periodont Res 27, 623-630, 1992.

Müller HP: Parodontologie, Georg Thieme, Stuttgart, 2001.

Müller HP, Lange DE, Müller RF.: Failure of adjunctive minocycline-HCl to eliminate oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol 20, 498-504, 1993.

Müller HP, Zoller L, Eger T, Hoffmann S, Lobinsky D: Natural distribution of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young men with minimal periodontal disease. J Periodont Res 31, 373-380, 1996.

Neumaier M, Braun A, Wagener S: For the International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular and Biology Techniques. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. Clin Chem 44, 12-26, 1998.

Newman HN.: The apical border of plaque in chronic inflammatory periodontal disease. Br Dent J 17, 105-113, 1976.

Norskov-Lauritsen N, Kilian M: Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb.nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov., and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol 56, 2135-2146, 2006.

Novak MJ, Novak KF: Early-onset periodontitis. Curr Opin Periodontol 3, 45-58, 1996.

Offenbacher S: Periodontal diseases: pathogenesis. Ann Periodontol 1, 821-878, 1996.

Page RC: Gingivitis. J Clin Periodontol 13, 345-354, 1986.

Page RC, Schroeder HE: Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest 33, 235-249, 1976.

Page RC, Schroeder HE: Periodontitis in man and other animals. A comparative review. S. Karger, Basel, 1982.

Page RC, Schroeder HE: Structure and pathogenesis. In: Schluger S, Yuodelis R, Page RC, Johnson R, (ed.): Periodontal diseases. Basic phenomena, clinical management, and occlusal and restorative interrelationships. Lea & Febiger, Philadelphia, 183-220, 1990.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE: Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol 183, 3770-3783, 2001.

Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE: The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. Periodontol 2000 42, 80-87, 2006.

Payne WA, Page RC, Ogilvie AL, Hall WB: Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. J Periodontal Res 10, 51-64, 1975.

Plagmann HC: Lehrbuch der Parodontologie. Carl Hanser, München, 1998.

Potts TV, Zambon JJ, Genco RJ: Reassignment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to the genus *Haemophilus* as *Haemophilus actinomycetemcomitans* comb. nov.. Int J Syst Bacteriol 35, 337-341, 1985.

Quirynen M, Bollen CML, Vandekerckhove BNA, Dekeyser C, Papaioanou W, Eyssen H: Full- vs. Partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections: short-term clinical and microbiological observations. J Dent Res 74, 1459-1467, 1995.

Ramberg PW, Lindhe J, Gaffar A: Plaque and gingivitis in the deciduous and permanent dentition. J Clin Periodontol 21, 490-496, 1994.

Renvert S, Wikström M, Helmersson M, Dahlen G, Claffey N: Comparative study of subgingival microbiological sampling techniques. J Periodontol 63, 797-801, 1992.

Reynolds JJ, Meikle MC: Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. Periodontol 2000 14, 144-157, 1997.

Riviere GR, Elliot KS, Simonson LG, Forgas LB, Nilius AM, Lukehart SA: Relative proportions of pathogen-related oral spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis. J Periodontol 63, 131-136, 1992.

Ritz HL: Microbial population shifts in developing human dental plaque. Arch Oral Biol 12, 1561-1568, 1967.

Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Goené RJ, Abbas F, de Graaf J: Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. J Clin Periodontol 17, 392-399, 1990.

Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ: Intracellular *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in buccal epithelial cells collected from human subjects. Infect Immun 69, 2700-2707, 2001.

Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. J Dent Res 84, 59-63, 2005.

Saiki R, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-491, 1988.

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A: Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. J Clin Periodontol 31, 1034-1047, 2004.

Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, Peros WJ, French CK: Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. J Periodontol 59, 431-438, 1988.

Schacher B, Baron F, Rossberg M, Wohlfeil M, Arndt R, Eickholz P: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* as indicator for aggressive periodontitis by two analysing strategies. J Clin Periodontol 34, 566-573, 2007.

Schroeder HE, Lindhe J: Conversion of established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. Arch Oral Biol 20, 775-782, 1975.

Seymour GJ, Powell RN, Aitken JF: Experimental gingivitis in humans. A clinical and histologic investigation. J Periodontol 54, 522-528, 1983.

Sixou M, Duffaut-Lagarrigue D, Lodter JP: A comparison between 4 subgingival bacteriologic sampling technics. J Biol Buccale 19, 16-21, 1991.

Slots J: The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. Scand J Dent Res 84, 1-10, 1976.

Slots J: The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. Scand J Dent Res 85, 114-121, 1977.

- Slots J: Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol 6, 351-382, 1979.
- Slots J, Bragd L, Wikström M, Dahlen G: The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. J Clin Periodontol 13, 570-577, 1986.
- Slots J, Reynolds HS, Genco RJ: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a Cross-sectional microbiological investigation. Infect Immun 29, 1013-1020, 1980.
- Slots J, Ting M: Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. Periodontol 2000 28, 106-176, 2002.
- Socransky SS: Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. J Clin Periodontol 6, 16–21, 1979.
- Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, MacDonald JB: The microbiota of the gingival crevice area of man. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. Arch Oral Biol 8, 275-280, 1963.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr: Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 25, 134-144, 1998.
- Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE: Checkerboard DNA-DNA hybridization. Biotechniques 17, 788-792, 1994.
- Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M, Ishikawa I: Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Periodontol 70, 574-580, 1999.
- Tanner ACR, Maiden MF, Zambon JJ, Thoren GS, Kent RL Jr: Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res 33, 105-117, 1998.
- Theilade E : Development and structure of dental plaque. Dtsch Zahnärztl Z 39, 606-610, 1984.
- Theilade E: The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. J Clin Periodontol 13, 905-911, 1986.
- Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H: Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodontal Res 1, 1-13, 1966.
- Topley WWC, Wilson GS: The principles of bacteriology and immunity, pp. 1-587. London. Edward Arnold, 1929.
- Tonetti MS: Etiology and pathogenesis. In: Lang NP, Karring T (eds.): Proceedings of the 1st european workshop on periodontology. Pp. 54-89, Quintessenz, London, 1994.



Tonetti MS, Mombelli A: Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 4, 39-52, 1999.

van der Weijden GA, Timmerman MF, Reijerse E, Wolffe GN, van Winkelhoff AJ, van der Velden U: The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol* 21, 583-588, 1994.

van Steenberghe D, Rosling B, Soder PO, Landry RG, van der Velden U, Timmerman MF, McCarthy EF, Vandenhoven G, Wouters C, Wilson M, Matthews J, Newman HN: A 15-month evaluation of the effects of repeated subgingival minocycline in chronic adult periodontitis. *J Periodontol* 70, 657-667, 1999.

van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, de Graaff J: Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Periodontol* 63, 52-57, 1992.

van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U: *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 29, 1023-1028, 2002.

Yang HW, Asikainen S, Dogan B, Suda R, Lai CH: Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 75, 592-599, 2004.

Zambon JJ: Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* 1, 879-925, 1996.

Zambon JJ, Christersson LA, Slots J: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* 54, 707-711, 1983.

## **7 Eigene Veröffentlichungen**

### **Posterpräsentationen :**

ÖGP Tagung in St. Wolfgang 03.-05.04.2008

Nachweishäufigkeit von Parodontalpathogenen in subgingivaler Plaque bei 2 Strategien zur Probenentnahme.

K. Himmer, M. Mayer, I. Mayer, O. Tabakci, B. Schacher, R. Arndt, B. Dannewitz, M. Wohlfeil, P. Eickholz.

DGP Tagung in Nürnberg 25.-27.09.´08

Nachweis von Parodontalpathogenen mit PCR aus subgingivaler Plaque von 4 oder 6 Stellen?

K. Himmer, I. Mayer, M. Mayer, B. Schacher, R. Arndt, B. Dannewitz, M. Wohlfeil, P. Eickholz.

NAGP Tagung in Koblenz 15.11.´08

Unterschiedliche Entnahmestrategien zum Nachweis von Parodontalpathogenen.

K. Himmer, I. Mayer, M. Mayer, M. Wohlfeil, B. Schacher, R. Arndt, B. Dannewitz, P. Eickholz.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Eickholz für die Überlassung des Dissertations-Themas und der notwendigen Materialien, für seine freundliche Unterstützung und Förderung.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Poliklinik für Parodontologie sowie den Mitarbeiterinnen der Praxis Dr. Mayer möchte ich mich für ihre Hilfestellungen bei der klinischen Durchführung der Studie bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Matthias, der mir bei allen Fragen stets zur Seite gestanden und mich immer wieder mit hilfreichen Anregungen motiviert hat. Vielen Dank für die Überlassung der Praxisräume, Einarbeitung der Mitarbeiterinnen sowie die große Geduld während der letzten Jahre.

Meinen Eltern möchte ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Betreuung meiner beiden Töchter Tiare und Magnolia bedanken. Ohne die Hilfe meiner Familie wäre die Fertigstellung der Dissertationsarbeit niemals möglich gewesen.

## **Curriculum Vitae**

**Irina Mayer**

**Frankfurt, den 24.12.2008**

**Name :** Irina Nicole Saskia Mayer geb. Miosga  
**Geb. Datum :** 05. Dezember 1974  
**Geb. Ort :** Frankfurt am Main  
  
Verheiratet mit Dr. med. dent., M.Sc. Matthias Mayer.  
  
zwei Töchter Tiare Sophie Mayer, sechs Jahre und  
Magnolia Estelle Mayer, zwei Jahre.

### **Schulische Ausbildung**

1981-1985 Holzhausen Grundschule in Frankfurt am Main.  
1985-1994 Heinrich-von Gagern - Gymnasium in Frankfurt am Main.  
10.06.1994 Absolvierung der allgemeinen Hochschulreife. Abschluss Abitur.

### **Berufliche Ausbildung**

1994-2000 Studium der Zahnmedizin an der Johann Wolfgang Goethe - Universität in Frankfurt am Main. Abschluss Staatsexamen.

10.12.2000 Approbation

1.03-31.12. 2001 Hospitanz in der Kieferorthopädischen Praxis Dr. Fritjof Hosang in Frankfurt am Main.

01.01.2001-31.12.2003 Postgraduierten – Weiterbildungsprogramm im Fachbereich Kieferorthopädie der Landeszahnärztekammer Hessen und dem zahnärztlichen Universitätsinstitut der Stiftung „Carolinum“ unter der Leitung von Herrn Prof. Peter Schopf.

1.01.2002-31.12.2004 Weiterbildungsassistentin in der Kieferorthopädischen Praxis Dr. Fritjof Hosang in Frankfurt am Main im Rahmen des Postgraduiertenprogramms.

01.01.2005-31.12.2005 Weiterbildungsassistentin in der Kieferorthopädischen Praxis Dr. Pascal Töpfer in Hanau im Rahmen des Postgraduiertenprogramms.

Ende 2005 Kieferorthopädische Facharztprüfung erfolgreich bestanden.

seit 2006 Niedergelassen in eigener Kieferorthopädischer Praxis in Frankfurt/M.

### **Mitgliedschaften und Auslandsfamulaturen**

AAO - American Association of Orthodontists.  
Famulatur in der Abteilung für Kieferorthopädie an der Tufts-University in Boston USA

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main eingereichte Dissertation mit dem Titel:

### **Analysestrategien für subgingivale Plaqueproben mittels semiquantitativer Polymerasekettenreaktion**

im Zentrum der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Carolinum) des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main (Poliklinik für Parodontologie) unter Betreuung und Anleitung von Professor Dr. Peter Eickholz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen, medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch zur Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 24. Dezember 2008